

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*  
(L.) Urban) DAN DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* (L.) Less)  
TERHADAP PANJANG DIESTRUS DAN PROLIFERASI EPITEL  
VAGINA TIKUS (*Rattus norvegicus*) BETINA**

**SKRIPSI**

Oleh:

**AMANATUL MUBTADIAH**

**NIM. 11620078**



**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM**

**MALANG**

**2018**

**PENGARUH KOMBINASIEKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*  
(L.) Urban) DAN DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* (L.) Less) TERHADAP  
PANJANG DIESTRUS DAN PROLIFERASI EPITEL VAGINA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) BETINA**

**SKRIPSI**

**Diajukan kepada:**

**Fakultas Sains Dan Teknologi**

**Universitas Islam Negeri (UIN)**

**Maulana Malik Ibrahim Malang**

**untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam**

**Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh:**

**AMANATUL MUBTADIAH**

**NIM. 11620078**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM**

**MALANG**

**2018**

**PENGARUH KOMBINASIEKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*  
(L.) Urban) DAN DAUN BELUNTAS (*Plucea indica*(L.) Less)TERHADAP  
PANJANG DIESTRUS DAN PROLIFERASI EPITEL VAGINA TIKUS  
(*Rattusnorvegicus*)BETINA**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**AMANATUL MUBTADIAH**

**NIM. 11620078**

**Telah disetujui oleh:**

**Dosen pembimbing I**

**Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah., M. Si**

**NIP. 19710912 200003 2 001**

**Dosen pembimbing II**

**Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Sc**

**NIP. 201309021 313**

**Tanggal, 22 Desember 2017**

**Mengetahui**

**Ketua Jurusan Biologi**



**Romaidi, M. Si.,D. Sc**

**NIP. 19811201 200901 1 019**

**PENGARUH KOMBINASIEKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban) DAN DAUN BELUNTAS (*Plucea indica*(L.) Less)TERHADAP PANJANG DIESTRUS DAN PROLIFERASI EPITEL VAGINA TIKUS (*Rattus norvegicus*)BETINA**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**AMANATUL MUBTADIAH**

**NIM. 11620078**

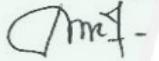
**Telah dipertahankan di Depan Dewan Penguji Tugas Akhir dan Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Pernyataan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains**

**Tanggal 22 Desember 2017**

**Susunan Dewan Penguji**

1. **Penguji utama** :Dr. Retno Susilowati, M.Si  
NIP. 19671113 199402 2 001

**Tanda Tangan**

(  )

2. **Ketua** :Kholifah Holil, M. Si  
NIP. 19751106 200912 2 002

(  )

3. **Sekretaris** : Dr. drh. Bayyinatul M, M. Si  
NIP. 19710912 200003 2 001

(  )

4. **Anggota** : Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Sc  
NIPT. 201309021 313

(  )

**Mengetahui dan Mengesahkan**  
**Ketua Jurusan Biologi**



  
**Romaidi, M. Si.,D. Sc**

**NIP. 19810201 200901 1 019**

**SURAT PERNYATAAN**  
**ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Amanatul Mubtadiyah  
NIM : 11620078  
Fakultas / Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi  
Judul Penelitian : Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) terhadap Panjang Diestrus dan Proliferasi Epitel Vagina Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya yang diwujudkan dengan skripsi / tugas ini merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tugas akhir / skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Desember 2017

Yang membuat pernyataan.


Amanatul Mubtadiyah

NIM. 11620078

## LEMBAR PERSEMBAHAN

*Bismillahirrahamanirrahim.*

Tulisan ini saya persembahkan untuk Allah Subhanahu wa Ta'ala, atas segenap karunianya baik yang berupa kesempatan, kemauan dan kemampuan yang tiada batas sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir / skripsi ini dengan baik. Satu janjiMu yang selalu membuat saya kuat, bahwa Engkau tak akan pernah menghinakan makhlukMu, tak akan pernah meninggalkannya, selama dia mau berusaha, dan usaha apapun itu selama tujuannya untuk beribadah, mencari keridhoanMu, maka tak ada yang tak mungkin dapat terjadi.

Kedua, teruntuk Mamak ku tercinta ibu Khoiriyah, dan adek tersayang Nazil Nur Aini. Terimakasih atas segala dukungan yang tak pernah ada habisnya, tak pernah surut kepada saya. Meskipun berbagi kekecewaan telah kutorehkan, namun sama sekali tak mengurangi sedikitpun sayangmu kepadaku. Untuk Bapak Alhmarhum Aruman Waluyo, terimakasih atas didikan yang sangat mempengaruhi pola pikir dan kepribadian saya selama ini. Bapak, semoga engkau ridho denganku, sekarang saya telah berhasil melampaui satu jenjang pendidikan formalmu, mewujudkan pesan yang senantiasa engkau kumandangkan “nak, kamu harus bisa melampaui pendidikan bapak”. Inilah salah satu senjata saya untuk tetap maju, pantang menyerah.

Kepada ibu saya Bu Bayyin dan bapak mujahidin yang telah dengan sabar membimbing saya hingga saat ini. Kepada ibu Iffah, mas basyar, pak eko, bu retno, bu evika, bu ainun, mas abi, pak suyitno, mbak ila, serta segenap guru-guru dan

teman-teman yang tak dapat saya sebutkan satu-satu. Terimakasih banyak atas didikan, dorongan, doa, serta kepedulian yang tiada batas terus mengalir setiap kali saya terjatuh dan mencoba untuk menyerah.

Keluarga besar Ponpes Darun Nun, Abi Halimy Zuhdi, Umma Sayyidah Hafsoh, ustadz Izzudin, Ustad Thoriq, ustad Rafiq, Ustad Muchad, Ustadzah Jumriyah, Ustadz Zangki. Saudara-saudara saya Risa, kak Izzati, Dewi, Alfi, Sholihah, Evi, Farla, Nadhifah, Riza, Mbak Ninis, Nila, Indah, Fitri, Najim, Zuhro, Intan. Sahabat-sahabat saya, Lala, Alvin, Mira, Iflahah, Mayang, mbak Yani, cong Yudrik, mbak Arifah, Bibah, Ima, Furqon, Coach Tegar Prajaksa, kepada suami tercinta Bambang Joko Purnomo dan masih banyak yang lain yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu. Terimakasih banyak atas dukungan serta doa yang tak pernah lelah mengalir. Dukungan kalian adalah semangat saya. Semoga dengan terselesaikannya tulisan ini akan memberikan kemanfaatan bagi kita semua, membuka pintu Ridho Allah semakin lebar, sehingga apapun ilmu yang diperoleh dapat menjadi ilmu yang bermanfaat di dunia maupun di akhirat. Cukup sekian, terimakasih.

*Alhamdulillahirabbil'alamin.*

## MOTTO

إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ

Allah tidak mengubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri (Q.S. Ar-Ra'd (13): 11).

**SESEORANG TIDAK AKAN PERNAH MENJADI MEKANIK SELAMA  
DIA TIDAK TAHU APA ITU MESIN, CARA MENGGUNAKANNYA, DAN  
FUNGSIONYA  
ILMU TIDAK AKAN PERNAH MENGHIANATI PENCARINYA,  
BELAJARLAH!**

## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji syukur kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala karunia, ridho yang tiada batas. segala limpahan rahmat taufiq dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) terhadap Panjang Diestrus dan Proliferasi Epitel Vagina Tikus (*Rattusnorvegicus*) Betina, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains (S.Si). Penelitian ini merupakan salah satu bagian dari penelitian Dr. drh. Bayyinatul M., M.Si dengan tema "Potensi Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) terhadap Reproduksi Tikus (*Rattusnorvegicus*) Betina".

Sholawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada baginda Rasulullah Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya yang telah berjuang di jalan Allah sehingga Islam sampai pada zaman sekarang.

Penyusun menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan bimbingan berbagai pihak. Untuk itu, iringan doa dan ungkapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Agselaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3. Romaidi, M. Si.,D. Scselaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah., M. Si. sebagai dosen pembimbing biologi. Terimakasih atas kesabaran serta keikhlasan telah memberikan bimbingan, pengarahan dan dorongan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Scselaku Dosen Pembimbing Agama atas bimbingan, dan pengarahan yang diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Segenap Dosen, Koordinator Laboratorium Fisiologi Hewan dan Hewan Coba Basyarudin, M.Si, Laboratorium Optik Murthada Zulfan, S.Si, serta staf administrasi Jurusan Biologi yang telah banyak membantu penyusunan skripsi ini.
7. Almarhum BapakAruman Waluyo, Ibu Khoiriyah, Adik Nazil Nur Aini, nenek Khomsatun, serta segenap keluarga yang telah memberikan dukungan dan ketulusan kasih sayang serta do'a yang tak pernah berhenti.
8. Suami tercinta Bambang Joko Purnomo, terimakasih atas dukungan, semangat dan motivasi yang tak pernah berhenti mengalir.
9. Bapak Hadi Suyitno yang telah membantu proses pembuatan preparat histologi.
10. Mukholifah, Hesti Amita, Wahyuningrum Mustikasari dan Ihda Sayyidatun Nikmah yang telah menjadi partnerterbaik selama pengerjaan penelitian skripsi.

11. Saudara-saudara saya segenap keluarga besar PP. Darun Nun, Keluarga Besar Mahasiswa Bidik Misi, terimakasih atas motivasi dan semangatnya.
12. Sahabat tercinta Biologi angkatan 2011 serta semua teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan dan semangat selama menyelesaikan skripsi.
13. Serta semua pihak yang telah membantu penulis secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca, utamanya bagi penulis secara pribadi. *Aamiin ya robbal 'alamin.*

*Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 20 Desember 2017

Penulis

## ABSTRAK

Mubtadiyah, Amanatul. 2017. **Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) terhadap Panjang Diestrus dan Proliferasi Epitel Vagina Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina.**

Pembimbing: Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Mujahidin Ahmad, S.Pt., M.Sc.

Kata kunci: siklus estrus, fase diestrus, ekstrak daun pegagan, ekstrak daun beluntas, proliferasi epitel vagina, tebal epitel vagina

Berbagai masalah kesehatan reproduksi seringkali muncul baik terhadap pria maupun wanita sehingga dibutuhkan obat yang bersifat alami untuk mengurangi efek samping yang biasa muncul pada penggunaan obat kimiawi. Beluntas dan pegagan telah banyak diketahui oleh masyarakat Indonesia sebagai tanaman yang memiliki manfaat sebagai obat. Efek pemberian ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap sistem reproduksi betina dapat diketahui dengan adanya perubahan siklus estrus, terutama pada fase diestrus. Perubahan panjang fase diestrus dipengaruhi oleh hormon seks, diantaranya adalah estrogen. Efek fitoestrogen terhadap vagina dapat diketahui dengan menentukan indeks maturasi epitel dan tingkat ketebalan epitel vagina.

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan rancangan penelitian RAL dengan jumlah ulangan sebanyak 4 kali. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina sebanyak 24 ekor. Perlakuan terdiri dari kontrol (K), dosis perlakuan pertama (P1) yakni sebesar 25 mg/kg bb. Dosis kedua (P2) yakni 50 mg/kg bb, ketiga (P3) 75 mg/kg bb, keempat (P4) 125 mg/kg bb dan yang kelima (P5) sebanyak 200 mg/kg bb. Data hasil penelitian meliputi panjang fase diestrus dan proliferasi (ketebalan dan maturasi sel) epitel vagina. Data dianalisis menggunakan ANOVA ( $\alpha$  5%) dan uji lanjut menggunakan BNT 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas tidak memberikan pengaruh terhadap panjang fase diestrus. Namun berpengaruh terhadap proliferasi epitel vagina, dibuktikan dengan peningkatan nilai indeks maturasi dan ketebalan epitel vagina yang semakin baik dengan pemberian ekstrak. Nilai indeks maturasi epitel vagina menunjukkan efek fitoestrogen paling tinggi diperoleh kelompok perlakuan dosis 75mg/kg bb (P3). Begitu pula dengan ketebalan vagina paling tinggi diperoleh kelompok perlakuan dosis 75mg/kg bb (P3) sehingga dosis ini yang paling optimal untuk digunakan sebagai suplemen fitoestrogen.

## ABSTRACT

Mubtadiah, Amanatul. 2017. **The Influence of Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban) and Beluntas (*Pluchea Indica* (L.) Less) Leaf Extract Combination to The Diestrus Length and Rat's (*Rattus norvegicus*) Vaginal Epitelial Proliferation.**

Supervisors: Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si and Mujahidin Ahmad, S.Pt., M.Sc.

Key word: estrous cycle, diestrus phase, pegagan leaf extract, beluntas leaf extract

Reproductive health problems came often to the man and woman, so it was needed natural medicine to decrease the side effect of chemical medicine. Pegagan and Beluntas had been known as natural medicines in Indonesia. The effect of Pegagan and Beluntas leaf extract combination on female reproductive system could be known by estrous cycle change, especially on diestrus phase. The alteration of diestrus length was influenced by sexual hormone like estrogen. The fitoestrogen effect of vagina could be known by determining epithelial maturation index and vaginal epithelial thickness.

This experimental research used Completely Randomized Design with four times repetition. 24 rats were used in this experiment. The treatment arranged in six groups. First grup became a control (K), the second group (P1) was given 22 mg/kg bb dosage. The third group (P2) was given 50 mg/kg bb dosage. The fourth group (P3) was given 75 mg/kg bb dosage. The fifth group (P4) was given 125 mg/kg bb dosage, and the last (P5) was given 200 mg/kg bb dosage. The result contained of a diestrus phase length and epithelial vaginal proliferation, and it would be analized by ANOVA ( $\alpha$  5%), and the advanced test used BNT test 5%.

The experimental result showed that Pegangan and Beluntas leaf extract combination had not influenced diestrus phase length but influenced epithelial vaginal proliferation. It was evidenced by decreasing maturation index value and good vaginal epithelial thickness after giving this extract. The maturation of epithelial vaginal index showed the highest fitoestrogen effect which was found on 75 mg/kg dosage (P3) treatment. Likewise the thickness vaginal epithel was gotten from 75mg/kg bw (P3) dossage treatment, so that it became optimal dosage which was used for fitoestrogen supplement.

## الملخص

مبتادية، أماناتول. ٢٠١٧. تأثير مزيج من أوراق بيغغان (سينتيلا أسياتيكا) (L) أوراق الحضر والأوراق بيلونتاس (بلوسا إنديكيا) (L) على طول ديستروس وانتشار الفئران ظهارة (راتوس نورفيجيكوس) الإناث

المؤدب : الدكتورة بينة المحترمة المحستير و الدكتور مجاهد أحمد المحستير

كلمات البحث: دورة الحمضيات، المرحلة ديستروس، بيغجان استخراج نبات، مستخلص أوراق بيلنتاس، انتشار الظهارية المهبلية، ظهارة مهبلية سمكة

من مختلف مشاكل الصحة الإنجابية على حد سواء للرجال والنساء على حد سواء، وهو ما يتطلب علاجاً طبيعياً للحد من الآثار الجانبية المعتادة على استخدام العقاقير الكيميائية. بيغغان و بيلونتاس وقد عرف على نطاق واسع من قبل شعب اندونيسيا كمنصع له فوائد كدواء. تأثير استخراج أوراق بيغغان و بيلونتاس على الجهاز التناسلي للأنثى يمكن أن يكون معروفاً من خلال تغيير دورة إستروس، وخاصة في مرحلة ديستروس. ويتأثر التغيير على المدى الطويل في ديستروس الهرمونات الجنسية، بما في ذلك هرمون الاستروجين. ويمكن تحديد آثار فيتوستروغنز على المهبل عن طريق تحديد مؤشر نضج الظهارية ومستوى سماكة الظهارية المهبلية.

هذا البحث هو تجريبي باستخدام تصميم البحث رال مع تكرار النسخ ٤ مرات. وكانت الحيوانات التجريبية المستخدمة الفئران الإناث (راتوس نورفيجيكوس) ما يصل إلى ٢٤ ذبول. وتألفت المعاملة من السيطرة، أول جرعة علاج ٢٥ ملغ / كغ ب.ب. الجرعة الثانية هي ٥٠ ملغ / كغ ب.ب، ثالث ٧٥ ملغ / كغ ب.ب، الرابع ١٢٥ ملغ / كغ ب.ب، والخامس هو ٢٠٠ ملغ / كغ ب.ب. بيانات الدراسة تشمل إذا كان هناك ( $\alpha$  /%) طول مرحلة ديستروس وانتشار (سماكة ونضج الخلايا) من ظهارة المهبل. تم تحليل البيانات باستخدام أنوفا ٥ فرق كبير ثم في الاختبار المتقدم باستخدام بنت ٥ %.

وأظهرت النتائج أن إعطاء مزيج من مستخلص أوراق بيغجان و بيلنتاس الأوراق لم يعطي تأثير على طول مرحلة ديستروس. ومع ذلك، فإن تأثير على انتشار ظهارة المهبل، التي أشارت إليها الزيادة في قيمة مؤشر النضج وسماكة الظهارية المهبلية هو الحصول على أفضل مع إعطاء استخراج. أظهرت قيمة مؤشر نضج الظهارية أعلى تأثير فيتوستروجين الحصول عليها من قبل مجموعة العلاج كغ / mg ب.ب. وبالمثل، فإن أعلى سمك المهبل التي تم الحصول عليها من قبل مجموعة العلاج جرعة ٧٥ / mg جرعة ٧٥ ب.ب بحيث أن هذه الجرعة هي الأكثر الأمل للاستخدام كمكمل فيتوستروجين.

## DAFTAR ISI

<b>SURAT PERNYATAAN</b> .....	v
<b>ORISINALITAS PENELITIAN</b> .....	v
<b>LEMBAR PERSEMBAHAN</b> .....	vi
<b>MOTTO</b> .....	viii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ix
<b>ABSTRAK</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>الملخص</b> .....	xiv
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xv
<b>BAB I: PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan.....	8
1.4 Hipotesis.....	8
1.5 Manfaat Penelitian .....	9
1.6 Batasan Masalah.....	9
<b>BAB II: KAJIAN PUSTAKA</b> .....	11
2.1 Deskripsi Pegagan ( <i>Centellaasiatica</i> (L.) Urban).....	12
2.1.1 Klasifikasi Pegagan.....	16
2.1.2 Manfaat dan Kandungan Pegagan.....	17
2.2 Deskripsi Beluntas ( <i>Plucheaindica</i> (L.) Less) .....	20
2.2.1 Klasifikasi Beluntas ( <i>Plucheaindica</i> (L.) Less).....	21
2.2.2 Kandungan dan Manfaat Beluntas ( <i>Plucheaindica</i> (L.) Less).....	22
2.3 Tinjauan tentang Tikus.....	23
2.3.1 Biologi Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	25
2.3.2 Klasifikasi Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	28
2.4 Anatomi Fisiologi Reproduksi Tikus .....	29
2.4.1 Siklus Estrus Tikus .....	31
2.5 Hormon Reproduksi Betina.....	37
2.6 Tinjauan tentang Vagina .....	40

2.6.1 Struktur Vagina.....	40
2.6.2 Pengaruh Estrogen Terhadap Proliferasi Epitel Vagina.....	45
2.6.3 Indeks Maturasi Vagina .....	49
2.7 Tinjauan Mengenai Dosis .....	50
2.8 Mekanisme Dan Peran Bahan Aktif Pegagan dan Beluntas.....	51
2.8.1 Triterpenoid Saponin .....	52
2.8.2 Flavonoid .....	57
2.8.5 Fitosterol .....	58
2.8.3 Tannin .....	59
2.8.4 Lignan .....	61
2.8.6 Asiatokosida.....	61
<b>BAB III: METODE PENELITIAN.....</b>	<b>63</b>
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	63
3.2 Waktu dan Tempat .....	63
3.3 Variabel Penelitian .....	64
3.4 Populasi dan Sampel .....	64
3.5 Alat dan Bahan.....	64
3.6 Pembagian Kelompok sampel.....	65
3.7 Prosedur Penelitian.....	66
3.7.1 Persiapan Hewan Coba dan <i>Run Down</i> Penelitian.....	66
3.7.2 Penyerentakan Siklus Birahi .....	67
3.7.3 Pembuatan Ekstrak Pegagan dan Beluntas .....	68
3.7.4 Penentuan Dosis Ekstrak.....	68
3.7.5 Pembuatan Larutan NaCMC.....	69
3.7.6 Pemberian Perlakuan .....	69
3.7.7 Metode Ulas Vagina .....	69
3.7.8 Penentuan Siklus Estrus.....	70
3.8 Pengambilan Data .....	72
3.8.1 Pembedahan dan Pengambilan Vagina.....	72
3.8.2 Pembuatan Preparat Histologi Vagina .....	73
3.9 Pengolahan Data.....	76

<b>BAB IV: HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	78
4.1 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban) dan Beluntas ( <i>Pluchea indica</i> ) terhadap Panjang Fase Diestrus Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Betina .....	78
4.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban) dan Beluntas ( <i>Pluchea indica</i> ) terhadap Proliferasi Epitel Vagina Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Betina .....	87
4.2.1 Indeks Maturasi Epitel Vagina .....	87
4.2.2 Tebal Epitel Vagina .....	95
<b>BAB V : PENUTUP</b> .....	95
5.1 Kesimpulan .....	104
5.2 Saran.....	105
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	106
<b>LAMPIRAN</b> .....	114

## DAFTAR GAMBAR

No.	Judul	Halaman
2.1	Gambar Tanaman Pegagan.....	14
2.2	Bunga Pegagan.....	14
2.3	Gambar Tanaman Beluntas.....	20
2.4	Anatomi Reproduksi Tikus.....	29
3.1	Sitologi Setiap Fase Siklus Estrus.....	71
4.1	Hasil Pemeriksaan Setiap Fase Pada Siklus Estrus.....	79
4.2	Diagram Rata-Rata Panjang Fase Diestrus Tikus Betina Selama 15 Hari Perlakuan Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Beluntas.....	80
4.3	Diagram Batang Indeks Maturasi Epitel Vagina Pada Berbagai Perlakuan Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Daun Beluntas Selama 15 Hari Perlakuan.....	89
4.4	Diagram Batang Rata-Rata Tebal Epitel Vagina Dalam Satuan Mikrometer Pada Berbagai Dosis Perlakuan Pemberian Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Daun Beluntas Selama 15 Hari Perlakuan.....	96
4.5	Histologi Vagina Tikus Perlakuan.....	98

## DAFTAR TABEL

No.	Judul	Halaman
2.1	Data Biologi Tikus.....	26
2.2	Data Reproduksi Tikus Betina.....	32
2.3	Indeks Maturasi Sel Epitel.....	49
3.1	Perbandingan Jenis Sel Pada Preparat Ulas Vagina Pada Setiap Fase Siklus Estrus.....	70
3.2	Kriteria Perubahan Bentuk Sel Aritel Vagina.....	72
3.3	Indeks Maturasi Sel Epitel Vagina.....	77
4.1	Ringkasan One Way Anova Tentang Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Beluntas Terhadap Diestrus Pada Tikus Betina.....	81
4.2	Hasil rata-rata indeks maturasi sel vagina yang dipengaruhi perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas.....	87
4.3	Ringkasan analisa statistik one way anova tentang pengaruh pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap indeks maturasi epitel vagina.....	88
4.4	Ringkasan BNT 5% Tentang Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Beluntas Terhadap Proliferasi Epitel Vagina.....	88
4.5	Distribusi sel epitel vagina yang dipengaruhi kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas.....	91
4.6	Data hasil rata-rata tebal epitel vagina yang dipengaruhi perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas.....	95
4.7	Analisa statistik anova tunggal pengaruh pemberian kombinsi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap tebal epitel vagina.....	95
4.8	Ringkasan BNT 5% Tentang Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Beluntas Terhadap Proliferasi Epitel Vagina.....	96

**DAFTAR LAMPIRAN**

No.	Judul	Halaman
1.	Data Hasil Perlakuan Dan Analisa Statistik Panjang Diestrus.....	114
2.	Data Dan Analisa Statistik Indeks Maturasi Epitel Vagina.....	116
3.	Rata-Rata Dan Hasil Perhitungan Tebal Epitel Vagina.....	119
4.	Perhitungan SPSS Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Beluntas Terhadap Panjang Diestrus.....	121
5.	Perhitungan SPSS Mengenai Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Beluntas Terhadap Indeks Maturasi Epitel Vagina.....	122
6.	Perhitungan SPSS Mengenai Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan Dan Beluntas Terhadap Tebal Epitel Vagina.....	124
7.	Dokumentasi Proses Penelitian.....	126

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Allah telah memberikan nikmat dengan jumlah yang tak terhingga kepada semua makhluknya. Segala kenikmatan tersebut Allah berikan untuk pemenuhan kebutuhan manusia di bumi. Sebagian firman Allah yang menyebutkan tentang kebesarannya berupa nikmat untuk manusia tertera dalam surah Al-Baqarah sebagai berikut:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ وَهُوَ  
بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

*“Dia-lah Allah, yang menjadikan segala yang ada di bumi untuk kamu dan Dia berkehendak menuju langit, lalu dijadikan-Nya tujuh langit. Dan Dia Maha Mengetahui segala sesuatu”* (Q.S. Al Baqarah 2: 29)

Surat al Baqarah tersebut menyiratkan bahwa Allah memberikan kemampuan luar biasa terhadap manusia untuk mengelola ciptaannya. Dapat dilihat pada kalimat *هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا* yang terjemahannya adalah *“Dialah yang menjadikan segala yang ada di bumi untuk kamu”*. Pada kalimat tersebut Allah menetapkan anugrah berupa eksistensi manusia berupa daya kelola yang tinggi dari semua makhluk lainnya di bumi (Al-Maraghi, 2000). Manusia diciptakan di bumi ini demi kepentingan perkara yang besar dan berharga. Karena begitu pentingnya sehingga segala sesuatu di dunia ini diciptakan untuk manusia (Imani, 2006) sebagai sarana beribadah. Sebagai salah satu bentuk perwujudan taqwa kepada Allah SWT, maka wajib bagi manusia untuk belajar dengan sungguh-sungguh dan mengerahkan segala kemampuannya untuk mengelola

dengan baik dan bijak alam yang dihamparkan di muka bumi, terutama terkait pemecahan masalah yang dihadapi di dunia.

Segala tindakan eksplorasi dan penelitian tidak terlepas dengan tujuan asalnya, yakni untuk memahami hak-hak Allah sehingga manusia mampu menunaikannya, dimana hak Allah atas hamba adalah beribadah kepada-Nya. Sebagaimana, disebutkan dalam Q.S. Adz-Dzaariyat (51): 56, bahwa semua ini bertujuan untuk memenuhi kewajiban untuk beribadah.

وَمَا خَلَقْتُ الْجِنَّ وَالْإِنْسَ إِلَّا لِيَعْبُدُونِ

*“Dan Aku tidak menciptakan jin dan manusia melainkan supaya mereka menyembah-Ku”* (Q.S. Adz-Dzaariyat 51: 56)

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah menciptakan jin dan manusia tidak main-main. Bukan tanpa sebuah tujuan, melainkan Allah menciptakan keduanya untuk beribadah dan tunduk kepada-Nya. Mentaati perintah dan menjauhi larangan-Nya, Allah menciptakan manusia dan jin untuk beribadah dan mengesankan-Nya (Al-Jazairi, 2009). Bentuk ibadah kepada Allah adalah dengan melakukan segala apa yang diperintah-Nya, termasuk perintah tadabur dalam firman Allah Q.S. Asy-Syu'ara ayat 7-8 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

إِنَّ فِي ذَلِكَ لآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾

7. Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?
8. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. dan kebanyakan mereka tidak beriman. (Q.S. Asy-Syu'ara 26: 07-08)

Kata *ila* pada awal ayat ini *Awalam yara ila al-ardh/apakah mereka tidak melihat ke bumi*, mengandung makna *batas akhir*. Makna batas akhir ini mengajak manusia untuk memikirkan ciptaan Allah yang ada di seluruh bumi misalnya aneka tanah, tumbuhan dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuhan-tumbuhannya (Shihab, 2002). Sesungguhnya, pada tumbuhan benar-benar terdapat bukti bagi orang-orang berakal atas kekuasaan penciptanya (Al-Maraghi, 2000). Berdasarkan ayat ini, terdapat perintah mengenai penelitian, eksplorasi dan pemanfaatan segala ciptaan Allah, terutama tumbuh-tumbuhan. Tumbuh-tumbuhan tersebut diantaranya adalah pegagan dan beluntas, yang mana sampai saat ini belum banyak informasi mengenai manfaat kombinasi kedua bahan ini terutama pada fisiologi reproduksi betina.

Salah satu tumbuhan yang bermanfaat sebagai obat yang sering dipakai masyarakat adalah Pegagan (*Centella asiatica*) dan Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Urban). Obat alami dari tumbuhan memiliki kelebihan yakni efek samping yang ditimbulkan lebih kecil daripada yang sering terjadi pada pengobatan kimiawi (Thomas, 1999) mulai dari terganggunya siklus estrus, dismenorea, lubang genitalia yang terasa gatal akibat infeksi *Candida albicans*, hingga terjadinya pendarahan yang banyak saat menstruasi (Anwar dkk, 2011). Pegagan dan beluntas seringkali dimanfaatkan masyarakat sebagai obat demam, keputihan, nyeri haid (Latief, 2014). Beberapa penelitian membuktikan beluntas bermanfaat sebagai anti-inflamasi, antibakteri dan hepatoprotektor (Ahemd *et all*, 2013) sehingga cukup aman apabila digunakan dalam dosis yang tinggi .

Pegagan dan beluntas memiliki senyawa aktif cukup beragam. Beluntas memiliki senyawa aktif berupa flavonoid, alkaloid, triterpen, tanin (Susetyarini, 2009), monoterpen atausesquiterpen, sterol, fenol, dan hidrokuinon (Widyawati dkk, 2012). Sedangkan pegagan memiliki bahan aktif utama terpenoid khususnya triterpenoid, terdiri atas asiaticosida, sentelosida, madekasosida, brahmosida dan brahminosida (glikosida saponin), asam asiaticentoic, asam centellic, asam centoic dan asam madekasat (Barnes, 2002).

Triterpenoid saponin mengandung steroid yaitu diosgenin atau yang sering disebut dengan genin. Genin dapat diubah menjadi progesteron melalui proses kimia yang disebut penguraian maker yakni bahan dasar pembentukan hormon untuk menghasilkan testosteron dan estradiol (Andria 2012). Estradiol yang merupakan salah satu tipe estrogen, kadarnya akan meningkat dengan pemberian ekstrak daun pegagan dan beluntas. Kadar estradiol yang tinggi akan menghambat (*inhibin*) hipofisis anterior dengan umpan balik negatif, sehingga hormon FSH dan LH tidak dikeluarkan oleh hipofisis anterior. Jika terjadi gangguan pada hormon FSH dan LH tidak akan terbentuk sel telur sehingga, hormon estrogen dan progesteron juga tidak akan terbentuk dan terjadi penurunan (Hall, 2009), akibatnya dapat terjadi gangguan siklus estrus karena faktor hormonal.

Gangguan siklus estrus dapat diketahui berdasarkan perubahan panjang siklus, baik secara keseluruhan maupun dari perubahan panjang tiap fasenya (Toelihere, 1985). Pertambahan panjang siklus estrus menunjukkan penurunan fertilitas, sedangkan pemendekan panjang siklus estrus berarti sebaliknya, fertilitas menjadi semakin baik. Pertambahan panjang siklus estrus dapat terjadi

apabila terjadi gangguan hormonal, sebagai feedback negatif akibat penambahan fitoestrogen ekstrak daun pegagan dan beluntas dengan dosis tertentu. Begitupula, panjang siklus estrus juga dapat diperpendek dengan penambahan fitoestrogen yang tepat (Urasopon et al. 2008).

Triterpenoid sebagai kandungan utama pegagan, terbukti dapat memberikan efek antifertilitas pada tikus betina (Kristanti 2010; Kurniawati, Darusman, and Rachmawaty 2005). Kandungan dari triterpenoid saponin selain asiaticosida terdapat juga madecosida dan asam asiatic. Asam asiatic diduga bersifat sitotoksik bila kadarnya dalam darah berlebihan (Andria *et al.* 2012). Maka digunakan perpaduan beluntas yang mengandung flavonoid lebih banyak sehingga dapat berfungsi sebagai antioksidan (Syamsudin, 2013). Selain itu, beluntas juga mengandung sterol dan triterpenoid, sehingga diharapkan dapat mempengaruhi status reproduksi betina, baik berupa efek kontraseptif maupun fertilitas.

Penerapan dosis mengacu pada penelitian terdahulu diantaranya Fitriyah (2009), yang menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan berpengaruh terhadap perkembangan folikel ovarium mencit. Folikel ovarium mengalami perkembangan pertumbuhan seiring meningkatnya dosis perlakuan (75 mg/kgbb, 100 mg/kgbb, dan 125 mg/kgbb) berupa perbanyakan jumlah. Besar kemungkinan hal tersebut dikarenakan jumlah zat aktif yang terkandung dalam dosis memiliki kemampuan sebagai fitoestrogen. Begitu juga dengan penelitian Kristanti (2010) yang menggunakan ekstrak daun pegagan dosis tinggi (125 mg/kgbb, 200 mg/kgbb, dan 275 mg/kgbb) dapat bekerja sebagai antifertilitas pada mencit betina.

Dosis yang diterapkan berhubungan dengan kadar fitoestrogen yang diperoleh tubuh. Produksi hormon estrogen yang tinggi mengakibatkan sel vagina berproliferasi dan mengelupas lebih cepat, dan sel endoserviks mensekresi lebih banyak mukus. Pada saat ovulasi, mukus serviks sangat banyak dan cair, dan deskuamasi sel vagina berada pada puncaknya (Raden, 2011). Estrogen memicu vagina untuk mensintesis kolagen. Konsentrasi estrogen yang tinggi, mengakibatkan penebalan dinding vagina sehingga sel-sel epitel mengalami pertandukan dan terlepas dari dinding epitel vagina (Kumar *et al*, 2005). Volume sekresi pada vagina normal bervariasi sepanjang siklus estrus. Acuan tersebut menjadi indikator pengaruh kadar fitoestrogen ekstrak daun beluntas dan pegagan terhadap proliferasi vagina, dan perpanjangan siklus estrus yang dilihat melalui metode ulas vagina.

Sehubungan dengan pemberian ekstrak pegagan dan beluntas sebagai fitoestrogen, penelitian Raden (2011) menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak pegagan dapat meningkatkan proliferasi epitel vagina. Peningkatan proliferasi epitel vagina ditunjukkan dengan penambahan ketebalan dinding vagina, melalui nilai indeks maturasi yang baik antara sel parabasal, epitel intermedia dan epitel superfisial. Nilai ini didapatkan dan mengkalkulasi jumlah sel parabasal (PB), sel intermediet (I), dan sel superfisial (S) yang disajikan dalam bentuk rasio yaitu PB: I: S.

Indeks maturasi digunakan untuk mengetahui seberapa kuat pengaruh fitoestrogen terhadap reproduksi hewan betina. Amran (2010) menjelaskan bahwa Dominasi sel superfisial menunjukkan kuatnya efek estrogen. Dominasi sel

parabasal menunjukkan lemahnya efek estrogen, yang nampak pada hasil pengamatan histologi vagina. Hasil penemuan sitologi sehubungan dengan status hormonal seorang wanita paling sering dinyatakan dalam bentuk indeks maturasi.

Perpanjangan siklus estrus pada hewan betina dapat dilihat dengan metode ulas vagina (*Pap smear*). Metode ini berguna untuk melihat setiap fase pada siklus estrus tanpa membedah hewan coba. Penentuan setiap fase, didasarkan atas penampakan sitologi pada ulasan, setiap hasilnya akan berbeda pada setiap fase. Dengan penggunaan kombinasi pegagan dan beluntas ini, diharapkan hasil yang diperoleh akan lebih efektif dan tepat sasaran, ditunjukkan dengan perubahan panjang siklus estrus dan proliferasi vagina yang ditunjukkan dengan indeks maturasi sel dan ketebalan epitel vagina. Mengingat sampai saat ini, belum ditemukan informasi mengenai pengkombinasian antara pegagan dan beluntas, untuk status reproduksi betina.

مَنْ اسْتَطَاعَ أَنْ يَنْفَعَ أَخَاهُ فَلْيَفْعَلْ

“Barangsiapa yang mampu memberi manfaat kepada saudaranya, maka hendaklah ia lakukan” (Shahih Muslim, kitab fadhail, bab ke-28, no. 132/2473).

Sebagai seorang muslim dianjurkan untuk dapat memberikan kemanfaatan terhadap manusia lainnya, oleh sebab itu penelitian ini dirasa perlu untuk dilaksanakan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan beberapa hal yang melatarbelakangi penelitian, maka dapat dirumuskan masalah sebagaimana berikut:

1. Apakah pemberian kombinasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Beluntas (*Pluchea indica*) memberikan pengaruh terhadap panjang fase diestrus tikus (*Rattus norvegicus*) betina?
2. Apakah pemberian kombinasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Beluntas (*Pluchea indica*) memberikan pengaruh terhadap proliferasi epitel vaginatikus (*Rattus norvegicus*) betina?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dilaksanakannya penelitian adalah untuk mengetahui:

1. Pengaruh pemberian kombinasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap panjang fase diestrus tikus (*Rattus norvegicus*) betina
2. Pengaruh pemberian kombinasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap proliferasi epitel vagina tikus (*Rattus norvegicus*) betina?

### 1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Ada pengaruh nyata pemberian kombinasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap panjang fase diestrus tikus (*Rattus norvegicus*) betina?
2. Apa pengaruh nyata pemberian kombinasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap proliferasi epitel vagina tikus (*Rattus norvegicus*) betina?

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah:

#### 1. Bagi peneliti

Dapat memberikan informasi kepada khasanah keilmuan biologi terapan bidang reproduksi tentang kandungan senyawa aktif daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan daun Beluntas (*Pluchea indica*) yang bermanfaat sebagai alternatif terapi hormon dan dapat digunakan sebagai landasan bagi penelitian selanjutnya.

#### 2. Bagi masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada masyarakat bahwa kombinasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan daun Beluntas (*Pluchea indica*) dapat dijadikan sebagai obat fertilitas maupun antifertilitas berdasarkan dosis yang tepat secara alami dengan pemberian secara oral.

### 1.6 Batasan Masalah

Beberapa batasan masalah yang kami gunakan adalah sebagai berikut:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur Wistar umur 1,5-2 bulan dengan berat badan rata-rata 120-150 gram
2. Panjang fase yang diukur adalah panjang fase diestrus yang ditentukan berdasarkan hasil ulas vagina, dengan penampakan sitologi berupa dominansi sel leukosit. Fase diestrus berlangsung selama kurang lebih 72 jam untuk tikus betina normal
3. Panjang satu siklus estrus berdasarkan penambahan waktu antara fase estrus, metestrus, diestrus dan proestrus.

4. Pembuatan ekstrak, menggunakan ethanol 70% yang dikerjakan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dengan perbandingan 800 ml etanol 70% untuk setiap 200 g simplisia
5. Proliferasi epitel vagina diperoleh dengan pengukuran menggunakan indeks maturasi vagina dan tebal epitel vagina menggunakan mikroskop komputer



## BAB II

### KAJIAN PUSTAKA

Allah menyerukan kepada segenap manusia untuk memperhatikan berbagai ciptaan-Nya yang luar biasa, sebagaimana dalam Q.S. surat Asy-Syu'ara ayat 7-8 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾

7. Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?
8. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. dan kebanyakan mereka tidak beriman. (Q.S. Asy-Syu'ara 26: 07-08)

Allah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan dengan beragam warna dan bentuk. Inilah bukti kekuasaan Allah SWT yang menjadikan-Nya berhak disembah (al-Qarni, 2008). Allah telah secara jelas memerintahkan manusia untuk berfikir tentang ciptaan Allah yang telah dihamparkan, sala satunya adalah tumbuhan yang bermacam-macam. Sesungguhnya segala yang diciptakan Allah merupakan pelajaran bagi manusia. Penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal (Q.S Ali Imran: 190), orang-orang yang mau berfikir, dan menggali lebih dalam ilmu pengetahuan, termasuk berbagai tumbuhan yang memiliki berbagai manfaat. Sesungguhnya, pada tumbuhan benar-benar terdapat bukti bagi orang-orang berakal atas kekuasaan penciptanya (Al-Maraghi, 2000).

Salah satu tumbuhan yang baik dan bermanfaat adalah pegagan dan beluntas. Pegagan dan beluntas merupakan salah satu tumbuhan yang terbukti mengandung zat-zat aktif yang dapat dimanfaatkan untuk kemaslahatan manusia. Antara lain dapat dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit, maupun untuk mengatasi masalah reproduksi. Obat alami dari tumbuhan memiliki kelebihan yakni minimalnya efek samping yang ditimbulkan seperti yang sering terjadi pada pengobatan kimiawi (Thomas, 1999). Sebagai salah satu bukti atas sabda Rasulullah SAW “Wahai hamba Allah, berobatlah kamu sekalian sebab Allah SWT tidak menjatuhkan penyakit melainkan Dia menurunkan obatnya, kecuali penyakit yang satu yaitu penyakit tua” (HR. Muslim).

Pegagan dan beluntas seringkali dimanfaatkan masyarakat sebagai obat demam, keputihan, nyeri haid (Latief, 2014) bahkan dapat juga digunakan sebagai kontrasepsi (Kristanti, 2010). Beberapa penelitian membuktikan beluntas bermanfaat sebagai anti-inflamasi, antibakteri, hepatoprotektor dan sebagainya. Bahkan di beberapa negara seperti Malaysia dan India daun Beluntas digunakan sebagai antitoksik bisa ular (Ahemd *et all*, 2013).

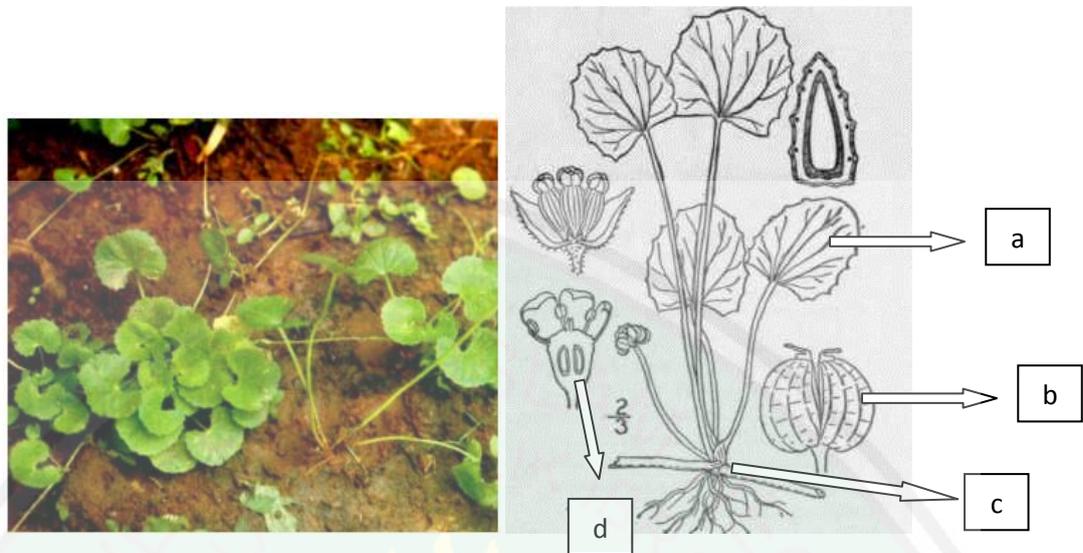
### **2.1 Deskripsi Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)**

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan tumbuhan kosmopolit artinya memiliki daerah penyebaran sangat luas terutama di daerah tropis dan subtropis. Pegagan menyebar liar dan dapat tumbuh subur di atas tanah dengan ketinggian 1 – 2.500 meter dari permukaan laut (dpl). Tumbuhan ini berasal dari Asia tropis dan sering ditemui tumbuh melimpah di tempat-tempat terbuka, seperti tegalan dan tempat yang agak terlindung. Tumbuhan ini lebih menyukai

lingkungan yang basah, seperti selokan, areal persawahan, tepi-tepi jalan, padang rumput bahkan tepi-tepi tembok atau pagar (Winarto, 2003). Kadang ditanam sebagai penutup tanah di perkebunan atau sebagai tanaman sayuran (sebagai lalap) (Andriani, et al., 2008).

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan tumbuhan terna tanpa batang, tahunan dengan pertumbuhan yang menjalar (Heyne, 1987). Spesies dari genus *Centella* kira-kira terdiri dari 33 spesies yang kesemuanya tersebar di daerah tropis dan subtropis (Kumar dan Gupta, 2006). Menurut Lasmadiwati (2004), spesies *Centella asiatica* (L.) Urban terdiri dari 2 jenis yang meliputi : pegagan merah dan pegagan hijau. Perbedaan mendasar antara pegagan merah dan pegagan hijau terletak pada warna stolon dan tangkai daun.

Warna stolon dan tangkai daun pegagan merah adalah hijau kemerahan, sedangkan pada pegagan hijau keseluruhannya berwarna hijau (Lasmadiwati, 2004). Warna hijau kemerahan pada stolon dan tangkai pegagan merah disebabkan oleh hadirnya zat aktif flavonoid. Menurut Jayanti (2007), flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang bertanggung jawab terhadap zat warna merah, ungu, biru dan sebagian zat warna kuning dalam tumbuhan. Flavonoid terikat pada molekul gula sebagai glukosida pada tumbuhan tingkat tinggi, flavonoid mempunyai salah satu fungsi sebagai pigmen.



Gambar2.1: Gambar tanaman pegagan. a. Daun tunggal, bertulang daun menjari; b. Bunga dengan daun pelindung; c. Akar, berupa stolon; d. Bakal buah(Lailani, 2008 dan feminous, 2008)



Gambar 2.2: Bunga Pegagan (Lailani, 2008)

Pegagan (*Centellaasiatica* (L.) Urban) ini merupakan tumbuhan berbiji tertutup dan berkeping dua. Merupakan herba dari famili yang memiliki potensi sebagai obat seperti jinten, seledri dan adas (Dasuki, 1991). Pada umumnya disebut sebagai Asiatic centella yang termasuk dalam family Umbelliferae. Tumbuhan berupa roset akar dengan tangkai daun yang lunak, perakaran dangkal dan berkembang biak dengan menggunakan stolon (Kumar dan Gupta, 2006).

Seperti halnya tumbuhan tingkat tinggi lainnya, pegagan memiliki beberapa organ tumbuhan yang meliputi: akar, stolon, daun, bunga dan buah. Akar dari

tumbuhan pegagan merupakan akar vertikal (Kumar dan Gupta, 2006). Pegagan merupakan tanaman terna menahun tanpa batang, dengan rimpang pendek dan stolon merayap, panjang 10-80 cm, akar keluar dari setiap bonggol, bercabang yang membentuk tumbuhan baru (Andriani, et al., 2008). Akarnya merupakan rimpang yang pendek serta mempunyai geragih (Savitri, 2006). Akar keluar dari setiap buku dan berupa akar tunggang berwarna putih dengan panjang mencapai 10 cm (Lasmadiwati, 2004).

Stolon pegagan tumbuh di atas permukaan tanah, dan berfungsi sebagai salah satu organ perkembangbiakan selain biji. Akar pegagan berupa rimpang dengan banyak stolon (akar membentuk rumpun), berkelompok dan lama kelamaan meluas hingga menutupi tanah, merayap dan berbuku-buku. Akar keluar dari buku-buku tersebut dan tumbuh menjurus ke bawah atau masuk ke dalam tanah. Akar berwarna agak kemeraha-merahan (Surbakti, et al., 2003). Setiap buku dari stolon akan tumbuh tunas yang menjadi cikal bakal tumbuhan pegagan yang baru. Tunas akan tumbuh menjadi beberapa daun tunggal yang tersusun dalam roset (Lasmadiwati, 2004).

Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5-15 cm berbentuk ginjal, tersusun dalam roset akar dan terdiri dari 2-10 helai daun. Daun berwarna hijau, berbentuk seperti kipas, buah pinggang, atau ginjal; permukaan dan punggungnya licin; tepinya agak melengkung ke atas, bergerigi dan kadang-kadang berambut; tulangnya berpusat di pangkal dan tersebar ke ujung serta berdiameter 1-7 cm. Tangkai daun berbentuk seperti pelepah, agak panjang, berukuran 5-15 cm tergantung dari kesuburan tempat tumbuhnya. Sepanjang tangkai daun beralur dan

di pangkalnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin, tidak berbulu, berpadu dengan pangkal tangkai daun (Surbakti, et al., 2003).

Bunga pegagan berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga sangat pendek, antara 5-50 mm (Andriani, et al., 2008), dan berwarna kemerah-merahan. Bunga-bunga ini tumbuh dalam tirai bunga yang sederhana dan terdiri dari 3-6 bunga (Sathya dan Ganga, 2006).

Bentuk bunga pegagan bundar lonjong, cekung dan runcing ke ujung dengan ukuran sangat kecil. Kelopak bunga tidak bercuping serta tajuk bunga berbentuk bulat telur dan meruncing ke bagian ujung. Bunga selanjutnya akan berkembang menjadi buah yang berupa buah buni. Buah pegagan berukuran kecil, panjang 2-2,5 mm, lebar 7 mm, berbentuk lonjong atau pipih, menggantung, baunya wangi, rasanya pahit, berdinding agak tebal, kulitnya keras, berlekuk dua, berusuk jelas dan berwarna kuning (Surbakti, et al., 2003). Buah berwarna hijau saat muda dan berubah menjadi kecokelatan saat sudah tua (Lasmadiwati, 2004).

### 2.1.1 Klasifikasi Pegagan

Tanaman pegagan dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Surbakti, et al., 2003) dan (Dasuki, 1991):

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub devisio	: Angiospermae
Klass	: Dicotyledone
Ordo	: Umbilales
Famili	: Umbelliferae (Apiaceae)
Genus	: Centella

Spesies : *Centella asiatica* L. (Urban), *Hydrocotyleasiatica* L. Pes. Equines Rumph.

Nama daerah : daun kaki kuda, daun aga, pegagan (Sumatera); pegagan, antanan gede, gagan-gagan (Jawa/Sunda); kos-tekosan (Madura); pegaga, daun tungke-tungke, kisu-kisu (Sulawesi); Nama asing; gotu kola (Amerika); indian pennywort, thick leaved pennywort (Inggris); bevilaque, cotylioie asiatique, hydrocote d'Asie (Prancis); Wassernabel (Jerman); watermavel, paardevoet (Belanda); ii xue cau, ban dai uyeh (Cina); brahmi (India); mani-muni (Assam); brahmamanduki (Benggala); karinga (Bombay); brahmi (Urdu); pegaga, penggaga, pegaga, tekukur, pegaga ular (Malaysia); bua bok (Thailand) (Surbakti, et al., 2003).

### 2.1.2 Manfaat dan Kandungan Pegagan

Di berbagai negara, pegagan sudah secara turun-temurun digunakan sebagai obat tradisional untuk berbagai jenis penyakit. Di India dan di benua Afrika, pegagan dipakai sebagai obat untuk mengobati berbagai penyakit, termasuk lepra atau kusta yang terkenal sangat sulit diobati. Sementara itu, di Perancis pegagan sudah ditetapkan sebagai tanaman obat sejak tahun 1884. Daun pegagan juga ditetapkan sebagai obat dalam farmakologi di berbagai negara, seperti Belanda, Meksiko, Spanyol, Venezuela, dan India. Tangkai pegagan pun telah diresmikan dalam materia medika Cina sebagai bahan pembuat obat sejak dulu (Surbakti, et al., 2003).

Pegagan memiliki kandungan zat kimia yang bermanfaat bagi manusia. Berbagai kandungan kimia yang sudah diketahui antara lain: alkaloid

hidrokotilina, centellose, oksiatikosida, mucilago, pektin, resin, gula pereduksi, protein, minyak atsiri, glikosida triterpenoid (asiatikosida, asam asiatat, asam madekasat), mineral, vellarine, tannin, (Martono et al. 2010), thankuside, isothankuside, brahmaside, brahmic acid, modasiatic acid, meso-inositol, centellose, carotenoids (Surbakti, et al., 2003).

Selain senyawa aktif, pegagan juga mengandung garam K, Na, Ca, Fe vellarine, tannin, mucilago, resin, pektin, gula, protein, fosfor, dan vitamin B. Di samping itu, pegagan mengandung sedikit vitamin C dan sedikit minyak atsiri (Surbakti, et al., 2003). Hasil pengujian dan analisa kandungan, dalam 100 g daun pegagan mengandung 34 kalori, 8,3 g air, 1,6 g protein, 0,6 g lemak, 6,9 g karbohidrat, 1,6 g abu, 170 mg kalsium, 30 mg fosfor, 3,1 g zat besi, 414 mg kalium, 6.580 mg betakaroten, 0,15 mg tiamin, 0,14 mg riboflavin, 1,2 mg niasin, 4 mg askorbat, dan 2,0 g serat (Duke, 1987).

Efek farmakologis atau efek pengobatan dari pegagan secara tradisional dan secara ilmiah sudah lama berkembang. Pegagan telah dikenal sebagai obat untuk revitalisasi tubuh dan pembuluh darah serta mampu memperkuat struktur jaringan tubuh. Pegagan dapat juga dikonsumsi sebagai brain tonic atau obat anti lupa bagi orang dewasa dan manula (manusia usia lanjut) (Surbakti, et al., 2003).

Pegagan tergolong sebagai *the most powerful healing herbs* atau tanaman obat paling mujarab. Sebutan itu diperoleh setelah melalui uji klinis, terbukti pegagan bisa merevitalisasi pembuluh darah, sehingga peredaran darah ke otak menjadi lancar. Dengan demikian, ada penambahan kapasitas kerja neurotransmitter di otak yang berfungsi untuk mengingat dan belajar. Dengan kata

lain, pegagan dapat meningkatkan kerja otak, mempertajam ingatan, serta menyembuhkan pasien yang mengalami gangguan jiwa (Surbakti, et al., 2003). Manfaat pegagan terhadap kemampuan kognitif telah dibuktikan beberapa hasil penelitian. Hasil yang diperoleh mengindikasikan dengan kuat bahwa ekstrak pegagan mempunyai peran penting dalam perbaikan profil hematologi dan meningkatkan fungsi kognitif (Mirza et al. 2013).

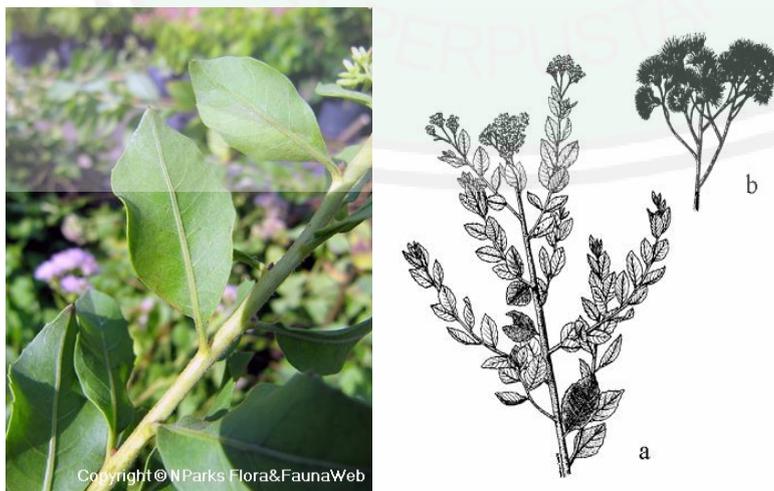
Rasa tajam, pahit dan sedikit manis yang terdapat pada tanaman pegagan berkhasiat untuk membantu memudahkan proses pencernaan dan sebagai pencahar, tetapi efeknya sangat sedikit. Karena itu, penggunaannya dicampur dengan simplisia yang memiliki efek sama. Pegagan juga bersifat menyejukkan atau mendinginkan, menambah tenaga, menimbulkan selera makan, memperindah suara dan mengurangi dahaga. Disamping itu, pegagan mempermudah timbulnya rasa kantuk bagi penderita sulit tidur, menenangkan saraf, memperbanyak sel-sel darah merah, serta menyembuhkan gangguan ringan di hati dan limpa yang membengkak (Surbakti, et al., 2003).

Selain efek farmakologis di atas, efek pengobatan lain dari pegagan adalah sebagai anti-infeksi, antiracun, penurun panas, peluruh air seni (diuretikum), antilepra, dan antisifilis. Efek farmakologis yang berupa antilepra dan antisifilis berasal dari teriterpenoid, yaitu asiaticoside dan vellarine. Pegagan mengandung zat saponin, asiaticosida, asam asiatat, dan madekasat yang mampu memacu produksi kolagen I, yaitu protein pemacu proses penyembuhan luka. Karenanya, tanaman ini bisa digunakan sebagai bahan baku perawatan kulit (Surbakti, et al., 2003).

## 2.2 Deskripsi Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less)

Beluntas merupakan tanaman semak atau setengah semak yang tumbuh tegak dapat mencapai 2 meter atau lebih. Percabangan banyak, berusuk halus dan berbulu lembut. Tumbuh liar di tanah tandus, di daerah kering pada tanah yang keras dan berbatu atau ditanam sebagai tanaman pagar (Andriani, et al., 2008). Tumbuhan ini memerlukan cukup cahaya matahari dan sedikit naungan, banyak ditemukan di daerah pantai atau dekat laut sampai ketinggian 1000 m dpl (Sirait, 2008).

Beluntas memiliki batang berkayu, bulat, tegak, bercabang, bila masih muda berwarna ungu setelah tua putih kotor. Daun tunggal, berbentuk bulat telur, tepi rata, ujung runcing dan bergerigi, pangkal tumpul, berbulu halus, panjang 3,8-6,4 cm, lebar 2-4 cm, pertulangan menyirip. Daun berwarna hijau terang dengan letak daun berseling. Daun yang masih muda segar memiliki rasa getir dengan bau yang khas (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991). Bila daun direbus dan di remas berbau harum (Sirait, 2008).



**Gambar 2.3** Gambar tanaman beluntas, a: daun, susunan daun tunggal, b: bunga tandan (Singapore government, 2013 dan Anonimous, 2003)

Beluntas memiliki bunga berbentuk bonggol, bergagang atau duduk di ujung cabang dan ketiak daun. Bunganya majemuk, mahkota lepas, putik bentuk jarum, panjang  $\pm 6$  mm, berwarna hitam kecoklatan, kepala sari berwarna ungu, memiliki dua kepala putik yang berwarna putih atau putih kekuningan (Andriani, et al., 2008). Menurut Pujowati (2008) bunga beluntas majemuk, dan berbentuk malai rata. Cabang bunga sangat banyak sehingga membentuk rempuyung cukup besar antara 2,5-12,5 cm. Bentuk bunga seperti silinder sempit.

Panjang daun pembalut sampai 4 mm. Daun pelindung bunga tersusun dari 6-7 helai. Daun pelindung yang terletak di dalam berbentuk sudut (lanset) dan di luar berbentuk bulat telur. Daun pelindung berbulu lembut, berwarna ungu dan pangkalnya ungu muda. Kepala sari menjulur dan berwarna ungu. Tangkai putik pada bunga betina lebih panjang. Buah beluntas longkang berbentuk seperti gasing, warnanya coklat dengan sudut-sudut putih, dan lokos (gundul atau licin) panjang buah 1 mm. Akar beluntas merupakan akar tunggang dan bercabang (Puspaningtyas, et al., 2013).

### 2.2.1 Klasifikasi Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less)

Klasifikasi tanaman Beluntas dalam sistematika tumbuhan, adalah sebagai berikut (Dasuki, 1991):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae

Genus : *Pluchea*

Spesies : *Pluchea indica* (L.) Less

*Pluchea indica* (L.) Less. Atau biasa dikenal dengan sebutan beluntas memiliki berbagai nama lain yaitu beluntas (Indonesia); luntas (Jawa); beluntas (Madura); baluntas, baruntas (Sunda); lamutasa (Makassar); eluntas (Sumatra). Di luar Indonesia, beluntas dikenal dengan sebutan lenaboui (Timor); Luan Yi (Cina); beluntas (malaysia dan singapura); dan Khlu (Thailand) (Puspaningtyas, et al., 2013).

### 2.2.2 Kandungan dan Manfaat Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less)

Berdasarkan hasil pengujian terhadap kadar antioksidan beluntas, diketahui daun beluntas mengandung grup senyawa flavonoid, tannin, sterol dan fenol hidroquinon. Selain senyawa tersebut, beluntas mengandung saponin, alkaloid, misalnya atsiri, asam amino (leusin, isoleusin, triptofan, treonin), lemak, kalsium, fosfor, besi, vitamin A, dan vitamin C (Susetyarini 2009). Daun beluntas juga mengandung sejumlah senyawa volatile kelompok terpena (Rao *et all*, 2011). Senyawa volatil ini merupakan penyusun minyak atsiri yang memberikan aroma khas pada daun beluntas (Puspaningtyas, et al., 2013).

Khasiat beluntas yang paling terkenal adalah menurunkan panas, menyembuhkan radang dan antiluka, mengobati skabies, mengobati gangguan saluran pencernaan, mengobati kelenjar leher (cercical tuberculous lymphaderitis), menambah nafsu makan, serta menghilangkan bau badan (Rao *et all*, 2011). Daun beluntas berpotensi sebagai duretik dan peluruh keringat. Beluntas bekerja sebagai antibakteri yang dibuktikan dengan penghambatan pertumbuhan

*Pseudomonas aeruginosa Multi Resistant* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (Sulistyaningsih, 2009).

Berbagai Khasiat beluntas sebagai antibakteri disebabkan adanya kandungan alkaloid, flavonoid, polifenol, tannin, monoterpen atau sesquiterpen dan kuinon pada ekstrak beluntas. Sehingga tidak mengherankan jika daun beluntas digunakan dalam terapi pengobatan radang dan antiluka, pengobatan gangguan saluran pencernaan, pengobatan penyakit sendi, serta pengobatan gangguan saluran napas (Puspaningtyas, et al., 2013). Selain itu, beluntas juga dapat digunakan untuk menghambat proliferasi sel kanker dan penetral racun ular (Cho *et al.*, 2012). Setiawan (1999) menuliskan bahwa tanaman beluntas dapat digunakan sebagai bahan antifertilitas pada betina.

### 2.3 Tinjauan tentang Tikus

Banyak manfaat yang diberikan binatang untuk manusia. Misalnya daging dan susu binatang dapat dijadikan makanan dan minuman, kulit dan bulunya dapat dijadikan sepatu dan pakaian, dijadikan sebagai tumpangan, kotorannya dapat digunakan sebagai pupuk (Imani, 2005). Selain sebagai hewan ternak, beberapa hewan yang memiliki manfaat sebagai hewan coba demi kemaslahatan manusia dengan syarat tidak menyiksa hal ini dijelaskan dalam Irsyadaat lithobibil Muslim hal. 12 dan sebagaimana yang terdapat di surat An Nahl ayat 5 sebagai berikut:

وَالْأَنْعَامَ خَلَقَهَا لَكُمْ فِيهَا دِفْءٌ وَمَنَافِعُ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ

“Dan Dia telah menciptakan binatang ternak untuk kamu; padanya ada (bulu) yang menghangatkan dan berbagai-bagai manfaat, dan sebagiannya kamu makan” (Q.S. An Nahl (16): 5)

Salah satu bentuk nyata kekuasaan Allah yang beripailmu, hikmah dan rahmat-Nya mengharuskan manusia untuk beribadah kepada kepada-Nya dan meninggalkan ibadah kepada selain-Nya. Binatang ternak tersebut adalah unta, sapi dan domba (Al-Jazairi, 2009). Dari kesemua hewan ternak yang disebutkan, dapat dilihat bahwa kesemuanya berasal dari kelas yang sama dengan tikus yakni mamalia. Hewan mamalia memiliki banyak kesamaan dengan manusia, baik secara struktur maupun fisiologinya (Hafez, 1970).

Allah ta'ala menciptakannya untuk keperluan manusia dan tidak menciptakan untuk selain mereka. Binatang-binatang ternak tersebut dapat dimanfaatkan sampai keturunannya, yang setiap tahun melahirkan sehingga manusia dapat mengambil manfaat dari anak-anak binatang tersebut. Maka, pemberi nikmat inilah yang harus disembah dan ditaati bukan selain Dia (Al-Jazairi, 2009).

Tikus merupakan hewan yang sangat mudah ditenakkan, dapat menghasilkan anak yang banyak (Booolootian, 1979), Oleh sebab itu tikus dapat dimanfaatkan sebagai hewan coba yang menguntungkan. Terlebih lagi terkait dengan diperbolehkannya membunuh tikus. Sebagaimana hadits yang menyebutkan bahwa ada lima binatang durhaka yang boleh dibunuh, baik ketika berihram maupun bukan, yaitu: burung gagak, rajawali, kalajengking, tikus, dan anjing gila (HR Bukhari dan Muslim).

Allah sungguh maha penyayang dan maha kekal rahmat-Nya. Oleh karenanya, Allah melimpahkan nikmat-Nya dan memudahkan semua urusan yang sukar. Di antara belas kasihan-Nya adalah menjadikan binatang-binatang

*An'am*(ternak) untuk memberikan berbagai kemanfaatan kepada manusia(ash-Shiddieqy, 2000). Maka, untuk memudahkan urusan dalam hal penelitian, yang hasilnya ditujukan untuk kepentingan manusia. Salah satu hewan tersebut adalah tikus terutama tikus percobaan.

### 2.3.1 Biologi Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*)seringkali digunakan sebagai hewan coba dalam berbagai penelitian (percobaan). Tikus diperkirakan berasal dari Asia, karena ditemukan fosil tikus tertua di India, dan Cina. Tikus berasal dari Asia, kemudian dibawa ke Norwegia, dan sampai di Inggris pada awal abad ke-18 (John, 1975) dan tikus diperkirakan mulai menyebar ke bagian Eropa sejak (Amori & Clout, 2002). Beberapa laporan menyebutkan bahwa tikus albino pertama kali digunakan dalam penelitian pada tahun 1856 oleh Philipeaux, ahli fisiologi Prancis yang menggunakan tikus albino untuk mempelajari andrenalectomy. Selanjutnya, Tikus putih mulai dikembang biakkan oleh Institute Wistar, oleh Donaldson pada 1906. Tikus putih yang ada sekarang merupakan hasil persilangan dan pengembangan dari tikus putih wistar dengan berbagai tkus liar, maupun tikus domestik varietas yang lain (John, 1975).

Secara fisik, ukuran badan jantan biasanya lebih besar daripada betina (Avalos & Callahan, 2001 dalam Nursyah, 2012). Tikus merupakan salah satu mamalia yang mempunyai peranan penting untuk tujuan ilmiah, karena memiliki daya adaptasi yang baik. Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil persilangan sesama jenis. Galur yang sering digunakan untuk penelitian adalah galur Wistar, Long-Evans dan Sprague- Dawley (Weihe, 1989).

Tikus wistar yang merupakan salah satu galur dari *Rattus norvegicus*. Jenis ini dikembangkan di Institut Wistar pada tahun 1906 untuk digunakan dalam penelitian biologi dan penelitian medis. Tikus wistar merupakan galur tikus pertama yang dikembangkan sebagai organisme model laboratorium yang menggunakan mencit (*Mus musculus*) atau mencit rumah. Lebih dari separuh dari semua strain tikus laboratorium adalah keturunan dari koloni asli yang dikembangkan oleh Henry Donaldson dan J. Milton, seorang peneliti genetika embriologi di Helen Dean King. Tikus galur wistar memiliki ciri-ciri kepala lebar, telinga panjang, dan ekor yang panjangnya tidak lebih panjang dari tubuhnya. Tikus wistar lebih aktif daripada jenis lain seperti tikus Sprague Dawley. Tikus wistar memiliki berat badan berkisar 150-200 gram pada usia 2 bulan (Hariadi, 2012).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan dalam percobaan, karena memiliki beberapa keunggulan yaitu penanganan dan pemeliharaannya mudah, biaya yang dibutuhkan tidak mahal, umur relatif pendek, sifat reproduksi menyerupai mamalia besar, lama kebuntingan singkat, angka kelahiran tinggi, siklus estrus pendek dan karakteristik setiap fase siklus jelas (Malole dan Pramono, 1989). Secara garis besar, data biologi tikus disajikan dalam tabel berikut:

**Tabel 2.1** Data biologi tikus (Kusumawati, 2004)

Berat badan	
Jantan (gram)	300 – 400
Betina (gram)	250 – 300
Lama hidup (tahun)	2,5 – 3
Temperatur tubuh (°C)	37,5
Kebutuhan air (ml/100g BB)	8 – 11
Kebutuhan makanan (g/100g BB)	5
Pubertas (hari)	50 – 60
Lama kebuntingan (hari)	21 – 23

Ukuran tubuh tikus yang lebih besar daripada mencit membuat tikus lebih disukai untuk berbagai penelitian. Berbeda dengan hewan laboratorium yang lainnya, tikus tidak pernah muntah. Disamping itu tikus tidak memiliki kelenjar empedu. Lambung tikus terdiri dari dua bagian yaitu nonglandular dan glandular dan small intestine terdiri dari duodenum, jejunum dan ileum. Pada umur 2 bulan berat badannya dapat mencapai 200-300 gram. Tikus tergolong hewan yang mudah dipegang, tetapi dibanding mencit tikus kurang photophobic (Kusumawati, 2004).

Fungsi dan bentuk organ, serta proses biokimia dan biofisik antara tikus dan manusia memiliki banyak kemiripan. Perbedaan antara tikus dan manusia antara lain terdapat pada struktur dan fungsi plasenta tikus, tingkat pertumbuhan tikus yang lebih cepat dari manusia, dan kurang pekanya tikus pada senyawa neurotoksik dan teratogen. Tikus dapat membuat vitamin C sendiri sedangkan manusia hanya memperoleh vitamin C dari makanan. Berbeda dengan manusia,

tikus tidak mempunyai kantung empedu. Sifat-sifat dari tikus yang sudah diketahui dengan sempurna inilah yang menjadikan tikus sering digunakan dalam penelitian (Malole dan Pramono, 1989).

### 2.3.2 Klasifikasi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tinjauan taksonomi tikus putih menurut Jasin (1984), adalah sebagai berikut:

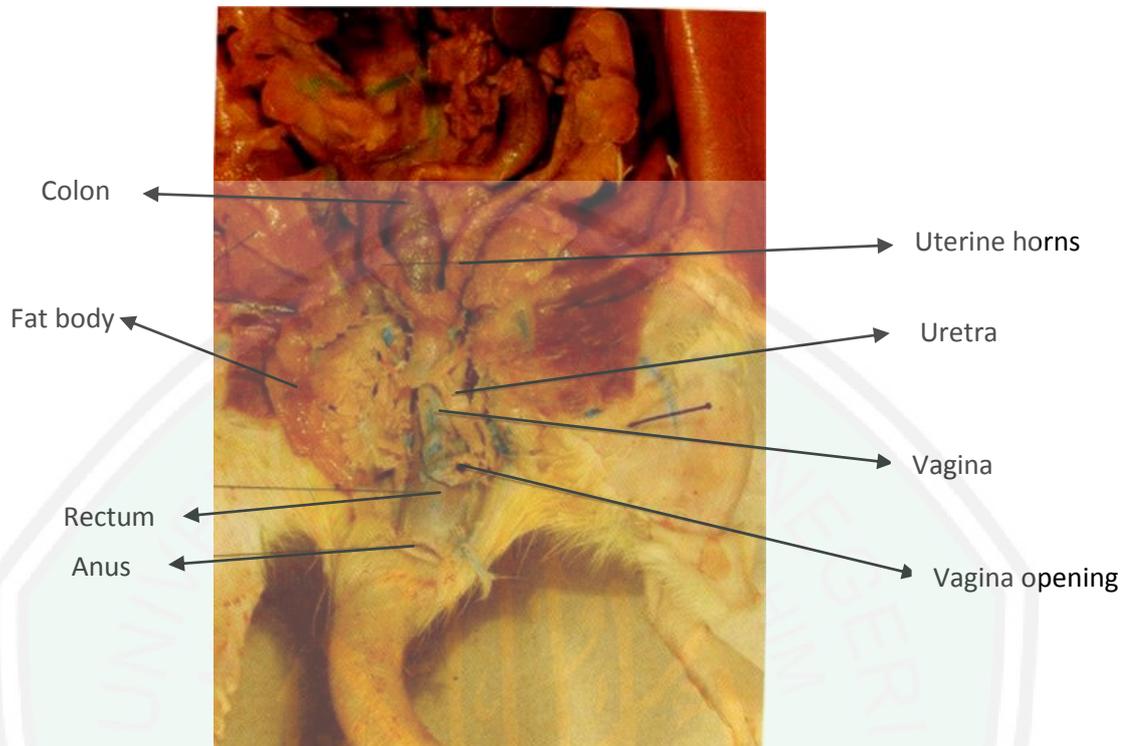
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muroidae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Telah dijelaskan oleh Jasin (1984), bahwa tikus termasuk kedalam ordo rodentia. Ordo rodentia terdiri atas famili muridae dan sciuridae. Tikus termasuk kedalam famili muridae, sama dengan *Mus musculus* (mencit), *Rattus mulleri* (tikus hutan), *Rattus diardii* (tikus merah), dan *Cavia cabaya* (marmut). Ordo rodentia memiliki ciri-ciri bertubuh kecil, beranggota badan berjari lima dan berkuku. Incisivi 1/1 x 2, berbentuk seperti pahat dan tumbuh terus. Tidak ber-cani, premolar 2/1, molar 3/3 (kadang-kadang 2/2). Berdasarkan ciri-ciri tersebut maka tikus putih (*Rattus norvegicus*) digolongkan kedalam ordo rodentia dan famili muroidae.

## 2.4 Anatomi Fisiologi Reproduksi Tikus

Sistem reproduksi betina, telur atau ova diproduksi oleh sepasang ovarium yang berada tepat dibagian posterior ginjal. Ovarium memiliki massa yang kecil berada di bagian terluar, dan membentuk sebuah organisasi yang kompak disebut folikel. Tikus memiliki oviduk yang kecil, tubulus pendek ini berfungsi untuk menerima dan mendorong ova dari ovarium. Ovidak terhubung dengan dua cabang uterus bikornua (Lytle, et al., 2005).

Uterus terdiri dari dua cabang yang luas atau berbentuk seperti tanduk yang terbuka secara terpisah menuju vagina. Tanduk uterus tersebut menggambarkan adaptasi morfologi yang signifikan sehingga memfasilitasi perkembangan beberapa embrio dan kelahiran secara multiple. Vagina mendorong dari badan uterus menuju badan eksterior dan menerima sperma selama populasi. Ova matang turun melewati ovidak yang dibuahi kedalam uterus. Telur yang telah dibuahi berikutnya terimplan ke dinding uterus periode gestasi (waktu untuk uterus berkembang sebelum kelahiran) pada tikus lab sekitar 21-22 hari. Anatomi reproduksi tikus betina sebagaimana disajikan pada gambar berikut (Lytle, et al., 2005):



Gambar 2.4 Anatomi reproduksi tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina (Lytle, et al., 2005)

Kelas mamalia betina memiliki dua ovarium yang terletak di belakang ginjal. Sebelah lateral dari masing-masing ovarium terdapat pembuluh ostium yang selanjutnya berhubungan dengan saluran silindris oviduk (tuba falopii). Kedua oviduk itu membentuk saluran yang berdinding tebal disebut uterus. Beberapa jenis mamalia masing-masing oviduk menggabungkan diri menjadi satu rongga. Dari uterus terjulur saluran yang disebut vagina yang terletak antara vesika urinaria dan rektum dan berakhir pada muara urogenitalis. Di sebelah ventral dari muara urogenitalis terdapat badan kecil yang homolog dengan penis hewan jantan (Jasin, 1984) dan (Booolootian, 1979).

Dalam reproduksi ova (ovum) dihasilkan oleh folikel graaf (folikel de graaf) yang kemudian masuk ostia. Di dalam oviduk ova akan dibuahi oleh sperma yang

pindah dari vagina setelah kopulasi. Ova yang telah dibuahi akan memisahkan diri pergi menempel dengan kuat pada dinding *cornu uterus* atau uterus. Dalam proses selanjutnya terbentuk membrana fetalis dan placenta. Melalui placenta itu embryo mendapat makanan dari induknya selama dalam kandungan sampai lahir (Jasin, 1984) dan (Booolootian, 1979).

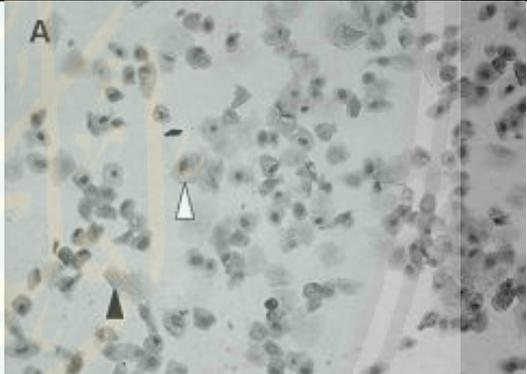
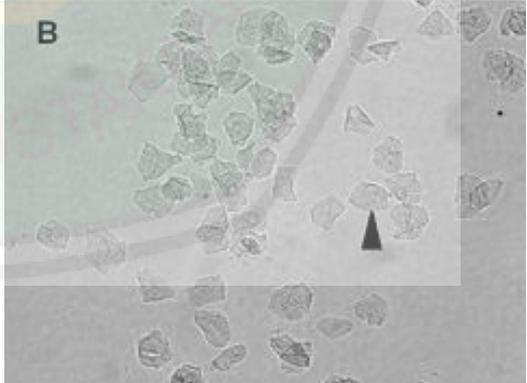
Vagina tikus membuka lebar pada umur 34-109 hari, sedangkan penurunan testis terjadi pada umur 15-51 hari. Kopulasi biasanya terjadi pada malam hari. Koagulasi semen membentuk copulatory plug yang merupakan sumbat vagina sehingga vagina tertutup selama beberapa jam sampai kemudian lepas terjatuh (Kusumawati, 2004). McNamara (2006) menyebutkan bahwa, tikus mengalami dewasa kelamin pada umur 60-90 hari. Lama kebuntingannya sekitar 20 -22 hari, sedangkan masa laktasinya adalah 21 hari. Masa hidup dari tikus putih ini adalah lebih kurang 4 tahun (Malole & Pramono 1989).

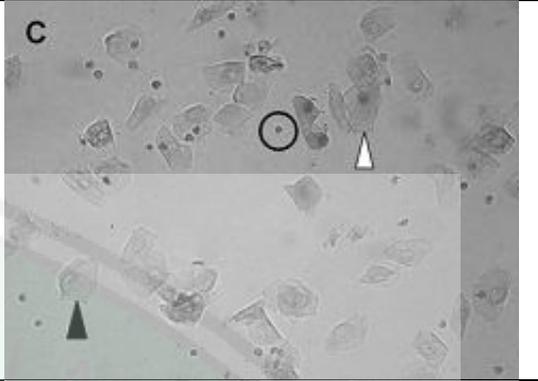
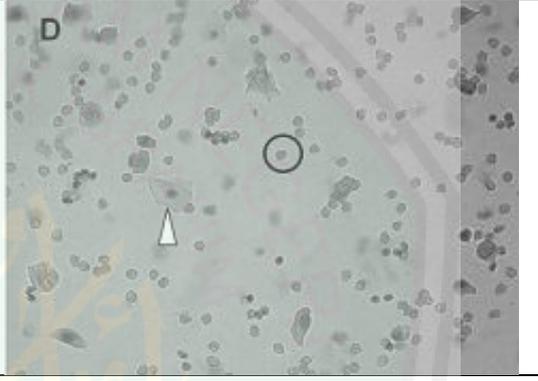
#### **2.4.1 Siklus Estrus Tikus**

Segala hal di alam ini tak lepas dari pengaturan Allah yang Maha Sempurna. Salah satu nama Allah adalah Al Mudabbir yakni maha mengatur, artinya tidak akan ada sedikitpun yang terlewat dari pengaturannya. Segala (urusan) yang kecil maupun yang besar adalah tertulis dan diatur oleh Allah (QS. Al Qamar (54): 53), yang berarti segala sesuatu telah ditetapkan Allah baik kadarnya maupun masanya termasuk siklus reproduksi tikus. Dalam aktivitas reproduksinya, tikus mempunyai sifat poliestrus yaitu hewan yang memiliki siklus berahi lebih dari dua kali dalam setahun. Siklus berahi dipengaruhi dan diatur oleh hormon-hormon reproduksi dan berlangsung selama 4-6 hari. Siklus berahi

pertama timbul setelah 1- 2 hari dari mulainya pembukaan vagina yang terjadi pada umur 28-29 hari (Malole dan Pramono 1989). Untuk menentukan tahapan deteksi siklus berahidapat dilakukan dengan teknik papsmear (ulas vagina), dengan melihat gambaran epitel vaginanya menggunakan mikroskop sehingga dapat dibedakan menjadi proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Partodiharjo, 1992). Data reproduksi tikus ditunjukkan dalam tabel 2.2 berikut:

**Tabel 2.2** Data reproduksi tikus betina (Hafez, 1970)

Tipe siklus estrus	Poliestrus	
	Lama	Gambar ulas vagina
Lama siklus estrus	4-6 hari	
Lama fase proestrus	12 jam	
Lama fase estrus	10-12 jam	

Lama fase metestrus	20-21 jam	
Lama fase diestrus	60-70 jam	
Mekanisme ovulasi	Spontan	
Lama kebuntingan	21-23 hari	
Berat anak sapih	35-50 g	

Keterangan : gambar Sitologi setiap fase pada siklus estrus. Tiga tipe sel yang teridentifikasi Leukosit (lingkaran), sel epitel kornifikasi (segitiga hitam) dan sel epitel berinti (segitiga putih). Fase estrus terdiri atas (A) proestrus, (B) Estrus, (C) Metestrus dan (D) Diestrus (Byers et al. 2012).

Fase estrus dipengaruhi mekanisme hormonal yaitu hubungan antara hormon-hormon hipotalamus-hipofisis (GnRH, LH, FSH), hormon-hormon ovarial (estradiol dan progesteron) dan hormon uterus (prostaglandin). Siklus estrus hewan dapat dibagi menjadi fase folikuler dan fase luteal dengan masing-masing memiliki periode perkembangan yang berkaitan dengan periode fungsional ovarium (Macmillan & Burke, 1996).

Fase folikuler merupakan fase siklus yang singkat dimulai dari awal pembentukan folikel sampai pecahnya folikel de Graaf saat ovulasi. Sedangkan fase luteal yang terjadi setelah ovulasi merupakan periode sekresi progesteron

oleh korpus luteum meliputi lebih dari dua pertiga siklus estrus. Berdasarkan histologi vagina, siklus estrus pada tikus dibagi menjadi empat stadium yaitu : proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Fase folikuler dimulai dengan proestrus yang diikuti oleh estrus dan ovulasi. Fase luteal terdiri atas metestrus yang diikuti oleh diestrus dan diakhiri dengan luteolisis (Macmillan & Burke 1996).

Proestrus merupakan fase menjelang estrus dimana gejala birahi mulai muncul akan tetapi hewan betina belum mau menerima pejantan untuk melakukan kawin. Pada fase ini folikel de Graaf tumbuh dibawah pengaruh FSH dan menghasilkan estrogen dalam jumlah banyak. Pada fase ini, estradiol menyebabkan betina mulai mau didekati jantan. Saluran reproduksi termasuk mukosa vagina mulai mendapatkan vaskularisasi yang lebih intensif sehingga sel-sel epitel saluran reproduksi mulai berproliferasi (Baker *et al.*, 1980).

Menurut Baker *et al.* (1980), fase proestrus dapat diketahui dengan adanya dominasi sel-sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau bertumpuk (berlapis-lapis) jika dilihat dengan menggunakan metode ulas vagina. Pada tikus fase ini berlangsung selama kira-kira 12 jam (Smith dan Mangkoewidjojo 1988). Fase proestrus akan dilanjutkan ke fase estrus yang ditandai dengan keinginan kelamin dan penerimaan pejantan oleh hewan betina untuk kopulasi. Pada fase ini estradiol yang berasal dari folikel de Graaf yang matang akan menyebabkan perubahan-perubahan pada saluran reproduksi betina (Toelihere, 1985).

Baker *et al.* (1980) menyatakan bahwa fase estrus dapat diketahui dengan adanya sel-sel tanduk yang banyak pada lumen vagina yang biasanya nampak pada preparat ulas vagina dan berlangsung selama 12 jam. Pembelahan dan proses

penandukan (kornifikasi) epitel vagina tergantung dari meningkatnya kadar estrogen dalam tubuh sehubungan dengan akhir periode pertumbuhan folikel. Proses estrus sangat erat kaitannya dengan mekanisme sistem hormonal.

Estrogen meningkatkan sensitivitas sel-sel penghasil gonadotropin pada hipofisa sehingga menghasilkan LH yang dapat menyebabkan ovulasi ketika kadar LH mencapai puncak saat fase estrus (Hafez et al. 2000). Telah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya bahwa pada saat estrus konsentrasi estrogen meningkat sesuai dengan pertumbuhan folikel de Graaf, dan selanjutnya di bawah pengaruh serta peran LH yang disekresikan dari hipofisis anterior terjadilah ovulasi dan pembentukan corpus luteum (CL) (Turner & Bagnara, 1998).

Ovulasi terjadi pada akhir estrus dalam waktu yang sangat singkat. Setelah ovulasi terjadi, pada ovarium akan mengalami fase luteal. Fase luteal adalah fase pembentukan CL yang dapat menghasilkan progesteron, sedangkan pada vagina terjadi fase metestrus, ditunjukkan dengan adanya sel epitel berinti, sel leukosit dan sel epitel kornifikasi pada hasil ulas vagina. Pada waktu CL telah mencapai ukuran maksimal dan fungsional akan terjadi peningkatan konsentrasi progesteron (Turner dan Bagnara, 1998; Byers et al. 2012).

Korpus luteum pada tikus tidak hanya memproduksi progesteron tapi juga memproduksi hormon estrogen, androgen dan hampir semua hormon steroid yang aktif (Khan et al, 1985). Menurut Silva et al (2004), secara in vitro FSH dapat mempengaruhi pertumbuhan folikel primordial pada kambing. Yu et al (2003) melaporkan bahwa FSH dan LH dapat mencegah terjadinya folikel atresia. Fase

metestrus merupakan kelanjutan dari fase estrus dan berlangsung selama 21 jam (Baker *et al*, 1980).

Smith dan Mangkoewidjojo (1988) menyatakan bahwa fase metestrus dibagi menjadi 2 stadium yaitu stadium 1 yang berlangsung kira-kira 15 jam dan stadium 2 kira-kira berlangsung selama 6 jam. Pada fase ini umumnya tidak terjadi perkawinan. Pada fase metestrus dan diestrus, uterus mengalami fase sekretoris. Pada fase ini, ovarium mengandung corpora lutea dan folikel-folikel kecil. Fase ini ditandai dengan bertumbuhnya CL dan sel-sel granulosa folikel dengan cepat yang dipengaruhi oleh LH dari adenohipofisa. Menurut Baker *et al* (1980) fase metestrus dapat diketahui dengan adanya dominasi sel-sel tanduk dan sel-sel leukosit jika dilihat dengan menggunakan metode ulas vagina. Selama metestrus, uterus menjadi agak lunak karena terjadi pengenduran otot serta melakukan persiapan untuk menerima dan memberi makan embrio.

Pelepasan epitel dan penyusunan leukosit terjadi bila kadar estrogen menurun dan bila pengaruh estrogen menghilang epitel vagina kembali dalam keadaan inaktif. Kondisi demikian disebabkan oleh banyaknya pembelahan mitosis yang terjadi di dalam mukosa vagina dan sel-sel baru yang menumpuk, sementara lapisan permukaan memiliki bentuk skuamosa dan mengalami penandukan. Sel-sel bertanduk ini terkelupas ke dalam lumen vagina (Partodihardjo, 1992).

Fase diestrus adalah fase setelah metestrus. Fase ini merupakan fase terpanjang diantara fase - fase siklus estrus lainnya. Fase diestrus berlangsung selama 60-70 jam. Pada fase ini kontraksi uterus menurun, endometrium menebal

dan kelenjar-kelenjar mengalami hipertropi, serta mukosa vagina menipis, warna lebih pucat dan leukosit yang bermigrasi semakin banyak. Gambaran ulsan vagina pada fase ini menunjukkan leukosit dalam jumlah yang banyak (Turner & Bagnara 1998).

## 2.5 Hormon Reproduksi Betina

Allah SWT telah berfirman dalam surat Al Qomar : 49 sebagai berikut:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (Q.S. Al Qomar (54): 49)

Ayat ini menerangkan bahwa seluruh makhluk yang ada adalah ciptaan Tuhan, diciptakan Nya menurut kehendak dan ketentuan Nya disesuaikan dengan hukum-hukum yang ditetapkan Nya untuk alam semesta yang terkenal dengan sunnatulkaun (undang-undang alam) dalam ayat lain yang bersamaan maksudnya Allah berfirman “yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan (Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya” (Al Furqan: 2) dan “Sucikanlah nama Tuhanmu Yang Maha Tinggi,yang menciptakan dan menyempurnakan (penciptaan-Nya), dan yang menentukan kadar (masing-masing) dan memberi petunjuk” (Al A’la: 1-3) (Dasuki, et al., 1990)

Maksudnya, Dia menetapkan suatu ukuran dan memberikan petunjuk terhadap semua makhluk kepada ketetapan tersebut (Muhammad, 2007). Allah SWT menciptakan segala sesuatu dan menentukan ukurannya sesuai ketetapan,

ilmu pengetahuan, dan suratan takdir-Nya. Jadi, semua yang terjadi di alam semesta pastilah berdasarkan takdir Allah SWT (al-Qarni, 2008). Begitupula dengan cara kerja hormon yang dalam kadar yang kecil dapat mempengaruhi fisiologi secara tepat.

Fungsi reproduksi wanita diatur melalui inti-inti tertentu pada hipotalamus menghasilkan dan memasukkan ke dalam darah polipeptida-polipeptida spersifik yang bekerja pada lobus anterior hipofisis dan mengeluarkan gonadotropin-gondotropin ini selanjutnya merangsang sekresi hormon-hormon ovarium (estrogen dan progesteron). Tempat pengaturan mekanisme hormon ovarium pada hipotalamus dapat menerangkan mengapa rangsangan otak nonspesifik dan kuat kadang-kadang dapat mempengaruhi fungsi reproduksi. Folikel yang sedang berkembang mensistesis estrogen, dan korpus luteum mensistesis progesteron. Sumber utama estrogen pada folikel sedang berkembang tampaknya adalah sel-sel teka interna (Junquiera, et al., 1982).

Fungsi reproduksi pada wanita diatur oleh interaksi berbagai hormon dari hipotalamus, hipofisis anterior, dan ovarium. Beberapa hormon dotemukan baik pada pria maupun wanita. *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) adalah faktor pembebas dari hipotalamus yang merangsang sekresi *Follicle-stimulating hormone* (FSH) dan *Luteinizing hormone* (LH) dari hipofisi anterior. Pelepasan GnRH dihambat oleh estrogen dan progesteron. LH disekresikan oleh sel basofolik kelenjar hipofisis anterior dan merangsang perkembangan korpus luteum di ovarium. FSH disekresikan dari sel basofilik kelenjar hipofisis anterior sebagai respons terhadap GnRH dan merangsang perkembangan folikel di

ovarium. Estrogen dan progesteron adalah hormon steroid yang disekresikan oleh folikel dan korpus luteum ovarium (Hall, 2009).

Ovarium mengeluarkan dua kelas hormon: estrogen dan progestin; estradiol adalah estrogen terpenting, dan progesteron adalah progestin dominan. Semua senyawa estrogen disekresikan dari ovarium, dengan hanya sejumlah kecil disintesis di korteks adrenal. Hampir semua progesteron pada betina yang tidak hamil dihasilkan oleh korpus luteum; hanya sedikit yang dibentuk di folikel matang pada hari segera sebelum ovulasi (Hall, 2009). Estrogen yang terutama yang diisolasi dari ovarium adalah  $17\beta$ -estradiol; dalam darah estron merupakan hormon utama yang beredar, disekresi langsung dalam jumlah kecil oleh ovarium dan ditimbun dalam sirkulasi oleh metabolisme estradiol dan androstenedion. Estron selanjutnya dimetabolisme menjadi estriol, mungkin dalam hati, estradiol merupakan estrogen yang paling potent diantara ketiganya (Junquiera, et al., 1982).

Estrogen menyebabkan pertumbuhan dan proliferasi sel-sel organ seks wanita dan jaringan lain yang berkaitan dengan reproduksi. Estrogen merangsang pertumbuhan dan perkembangan uterus serta organ seks eksternal wanita. Saat pubertas kadar estrogen meningkat pesat menimbulkan pertumbuhan cepat ovarium, tuba fallopii, uterus, vagina, dan genitalia eksterna. Lapisan dalam uterus, endometrium, menjadi lebih tebal di bawah pengaruh estrogen (Hall, 2009).

## 2.6 Tinjauan tentang Vagina

### 2.6.1 Struktur Vagina

Vagina merupakan suatu saluran musculo membranosa yang menghubungkan uterus dengan vulva, terletak antara kandung kemih dan rectum. Dinding depan vagina berukuran 9 cm dan dinding belakang 11 cm. Pada dinding vagina terdapat lipatan-lipatan yang berjalan circular dan disebut rugae. Lipatan-lipatan ini memungkinkan vagina pada persainan melebar, sesuai dengan fungsinya sebagai bagian lunak jalan lahir. Setelah melahirkan, sebagian rugae akan menghilang. Pada vagina tidak terdapat kelenjar-kelenjar bersekresi. Ke dalam puncak vagina menonjol ujung serviks (Martalia, et al., 2012).

Bagian serviks yang menonjol ke dalam vagina disebut portio. Sel-sel dari lapisan atas epitel vagina mengandung glikogen yang menghasilkan asam susu karena adanya basil-basil Doderlein sehingga vagina mempunyai reaksi asam dengan pH  $\pm$  4,5 sebagai proteksi terhadap invasi kuman. Fungsi vagina adalah: 1) sebagai saluran keluar dari uterus yang dapat mengalirkan darah menstruasi dan secret dari uterus, 2) sebagai alat persetubuhan, 3) sebagai jalan lahir pada waktu partus (Martalia, et al., 2012).

Vagina merupakan rongga muskulo membranosa berbentuk tabung mulai dari tepi serviks uteri di bagian kranial dorsal sampai vulva di bagian kaudal ventral. Daerah sekitar serviks disebut vorniks, dibagi dalam empat kuadran yaitu forniks anterior, forniks posterior, serta forniks lateral kanan dan kiri. Vagina memiliki dinding ventral dan dinding dorsal yang elastis. Dilapisi epitel squamosa berlapis, yang berubah mengikuti siklus estrus (Wulanda, 2011).

Fungsi vagina untuk mengeluarkan ekskresi uterus pada haid, untuk jalan lahir dan untuk kopulasi (persetubuhan). Bagian atas vagina terbentuk dari duktus Mulleri, bawah dari duktus urogenitalis. Batas dalam secara klinis yaitu fornix anterior, posterior, dan lateralis disekitar serviks uteri. Titik Grayenberg (G-spot) merupakan titik daerah sensorik disekitar anterior dinding vagina, sangat sensitif terhadap stimulasi orgasme vaginal (Wulanda, 2011).

Vagina sebagai saluran terdepan sistem pembiakan betina, antara vestibula genitalia luar dan serviks. Dinding vagina terdiri dari 3 lapis: mukosa, otot polos, dan jaringan ikat (adventitia). Lapisan mukosa terdiri dari epitel dan lamina propria. Sel epitel beberapa lapis dan terluar menggepeng. Dalam keadaan normal lapisan epitel ini tak menanduk pada primata, tapi menanduk pada rodentia. Pada rodentia sel-sel epitel menanduk ini dijumpai waktu dilakukan usapan vagina (Yatim, 1994). Teknik usapan vagina (Vagina smear atau pap smear) dipakai untuk mengetahui fase-fase daur estrus, yang berarti untuk menentukan masa subur. Metode ini sering digunakan untuk eksperimen di laboratorium, untuk menetapkan waktu mengawinkan yang tepat, serta menentukan usia embryo (Yatim, 1996).

Vagina terbagi atas bagian vestibulum yaitu bagian ke sebelah luar yang berhubungan dengan vulva, dan portio vaginalis cervicis yaitu bagian ke sebelah serviks. Batas dari kedua bagian itu ialah tepat di kranial daripada munculnya uretra. Jadi muara uretra itu ikut vestibulum vagina. Lapis muskular di bagian vagina tidak sebaik selapis-lapis muskulatur di bagian serviks maupun uterus. Tetapi masih tetap terdiri dari 2 lapis yaitu: lapis memanjang (longitudinal) tipis,

merupakan lapis luar, dan lapis lingkar (circulair) agak tebal di bagian dalam. Diantara kedua lapisan muskulatur tersebut, terdapat tenunan pengikat loggar maupun padat. Disini terdapat banyak pula plexus-plexus vena dan beberapa kelompok sel-sel syaraf perasa (Partodihardjo, 1992).

Pada vagina tak didapati kelenjar. Kalau terdapat lendir dalam vagina pada hewan birahi, maka lendir itu berasal dari serviks. Pada hewan betina dara, ada selaput tipis yang merupakan sekat atau batas antara vestibulum vaginae dan portio vaginalis cervicis, disebut hymen. Selaput ini terbentang transversal menutup vagina. Histologi hymen terdiri atas lapisan epitel sisik (stratified squamous epithelium). Pada umumnya, hymen karena tipisnya robek dan hilang pada waktu hewan mencapai dewasa. Hanya kadang-kadang hymen tinggal tidak robek karena tebalnya. Hymen ini tentu menghalangi kopulasi yang normal, hingga perlu dirobek dengan pisau, pada babi dara hymen dapat diraba dengan jari (Partodihardjo, 1992).

Hewan betina yang normal dan tidak bunting, epitel mukosa vaginanya secara periodik berubah. Perubahan ini berada di bawah pengaruh hormon yang disekresikan oleh ovarium. Epitel itu bisa berbentuk kubus, dapat pula berbentuk tipis, berlapis-lapis serupa sisik, tergantung pada status hewan betina itu dalam siklus birahinya. Perubahan histologi pada vagina mempunyai hubungan erat dengan perubahan pada ovariumnya (Partodihardjo, 1992).

Mukus yang terdapat dalam lumen vagina berasal dari kelenjar-kelenjar cerviks uteri. Epitel lapisan mukosa adalah berlapis gepeng dan mempunyai tebal 150-200  $\mu\text{m}$ . Sel-selnya dapat mengandung sejumlah keratohialin. Akan tetapi,

keratinisasi yang nyata disertai perubahan sel-sel menjadi lempeng-lempeng keratin seperti pada epitel bertanduk tidak terjadi (Junquiera, et al., 1982).

Dibawah rangsangan estrogen, epitel vagina mensintesis dan menimbun glikogen dalam jumlah besar, yang dikeluarkan ke dalam lumen vagina waktu sel-sel vagina mengalami deskuamasi atau terkelupas. Bakteri dalam vagina memetabolisme glikogen dan membentuk asam laktat, yang bertanggung jawab akan pH vagina yang biasanya rendah (Junquiera, et al., 1982).

Lamina propria kaya akan pembuluh darah. Ketika rangsangan sex waktu coitus darah ini sumber cairan yang membasahi vagina. Lapisan otot terdiri dari berkas yang melingkar dan memanjang, dan dekat lobang ke luar ada sedikit otot lurik berupa cincin. Lapisan adventitia terdiri dari lapisan tipis jaringan ikat rapat. Dalam jaringan ikat banyak plexus vena, berkas urat saraf. Jaringan ikat itu banyak serat elastisnya. Ini semua menciptakan vagina itu jadi kenyal, peka dan dapat mengencup-mengembang waktu coitus. Jadi bersifat erekstif juga, seperti halnya penis. Jaringan dalam vagina asam, meski asalnya dari serviks. Karena pH yang rendah maka rongga vagina tidak menguntungkan bagi semen (Yatim, 1994).

Lamina propria tersusun atas banyak serat elastis dan limfosit. Tunica muskularis berada di sebelah luar tunika mukosa, mengandung serat otot polos dua lapis, sesuai dengan letak seratnya, sirkuler dan longitudinal. Pada beberapa tempat terdapat pula serat miring (obliquus) (Yatim, 1996). Jaringan ini sangat kaya akan serabut-serabut elastin. Diantara sel-sel yang ada dapat ditemukan limfosit dan neutrofil dalam jumlah yang relatif banyak. Selama fase siklus

mentruasi tertentu, kedua jenis leukosit ini biasanya menginvasi epitel dan masuk ke dalam lumen vagina. Lamina propria yang tidak mengandung kelenjar menunjukkan banyak pembuluh darah yang merupakan sumber cairan eksudat yang merembes melalui epitel berlapis selama perangsangan seksual. Mukosa vagina sebenarnya tidak mengandung ujung-ujung saraf sensoris, dan beberapa ujung saraf telanjang yang mungkin merupakan serabut-serabut rasa sakit (Junquiera, et al., 1982).

Lapisan muskularis vagina terutama terdiri atas berkas-berkas longitudinal serabut otot polos. Terdapat sedikit berkas sirkuler, khususnya pada bagian paling dalam (dekat dengan mukosa). Diluar lapisan muskularis, terdapat jaringan penyambung padat, selubung adventitia, kaya akan serabut-serabut elastin yang tebal, menghubungkan vagina dengan jaringan sekitarnya. Elastisitas vagina yang besar dihubungkan dengan jumlah serabut-serabut elastin yang banyak dalam jaringan penyambung dindingnya. Dalam jaringan penyambung ini terdapat banyak pleksus-pleksus vena, berkas-berkas saraf dan kelompok-kelompok sel-sel saraf (Junquiera, et al., 1982).

Pemeriksaan sitologi mukosa vagina memberikan data penting mengenai keseimbangan hormonal dan memungkinkan penemuan dini beberapa jenis kanker pada sistem genitalis wanita. Sel-sel yang diperiksa diambil dari vagina dengan sekret yang dikandungnya. Sekret ditebarkan pada slide, difiksasi, dan diwarnai dengan teknik khusus seperti teknik trikrom Shorr, akridin jingga, dan sebagainya. Sel-sel dari epitel vagina menonjol pada jenis sediaan (Junquiera, et al., 1982).

### 2.6.2 Pengaruh Estrogen Terhadap Proliferasi Epitel Vagina

Vagina merupakan sarung fibromuskular yang elastis yang menghubungkan genitalia eksterna dengan genitalia interna dan terdiri atas epitel dalam beberapa lapisan yang terdiri atas satu lapisan sel basal kubus, beberapa lapis sel intermediet yang tipis (epitel gepeng berlapis). Perubahan ketebalan dan maturasi dari epitel ini, serta kandungan glikogen di dalamnya berhubungan dengan status hormonal. Estrogen mengaktivasi mitosis dan berhubungan dengan peningkatan ketebalan epitel dan peningkatan jumlah glikogen. Vagina menjaga keseimbangan ekologi terhadap pengaruh hormon, epitel yang sensitif terhadap hormon dan berbagai macam bakteri berinteraksi untuk mempertahankan lingkungan yang sehat. Dalam hal ini, estrogen berperan pada reseptor untuk merangsang proliferasi dan maturasi (Amran, 2010).

Efek biologis estrogen diperantarai oleh reseptor estrogen. Reseptor estrogen adalah faktor transkripsi yang memediasi efek pleiotropik hormon steroid terhadap pertumbuhan, perkembangan dan pemeliharaan bermacam-macam jaringan. Estrogen mempengaruhi proliferasi, differensiasi dan keratinisasi epitel melalui pengaturan produksi beberapa protein yang terlibat dalam proliferasi sel dan pengaturan siklus sel (Arina, 2008). Pada epitel vagina, ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  lebih banyak dibandingkan reseptor estrogen  $\beta$ . Reseptor estrogen  $\alpha$  dibutuhkan untuk proliferasi, stratifikasi dan kornifikasi sel epitel vagina yang diinduksi oleh estrogen dan reseptor estrogen  $\beta$  saja tidak cukup untuk memediasi efek estrogen ini tanpa adanya reseptor estrogen  $\alpha$  (Buchanan, 1998).

Reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  dapat membentuk heterodimer untuk merangsang transkripsi gen-gen yang mengatur proliferasi dan siklus sel. Bentuk heterodimer reseptor estrogen  $\alpha/\beta$  dapat berikatan pada DNA dengan afinitas yang sama dengan homodimer reseptor estrogen  $\alpha$  dan lebih besar daripada homodimer reseptor estrogen  $\beta$ . Reseptor estrogen  $\beta$  dapat menghambat aktivasi transkripsional yang dimediasi oleh reseptor estrogen  $\alpha$  jika terdapat dalam bentuk heterodimer. Jaringan target yang berbeda dapat memberikan respon yang berbeda pula terhadap rangsangan hormon yang sama oleh karena adanya perbedaan komposisi reseptornya. Variasi rasio reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  pada sel yang berbeda menyebabkan perbedaan jumlah homodimer dan heterodimer yang terbentuk sehingga efek estrogen bersifat spesifik terhadap tipe sel dan jaringan (Buchanan, 1998).

Penelitian pada epitel vagina menunjukkan bahwa banyaknya reseptor estrogen tidak berbeda baik pada wanita masa menstruasi maupun wanita pascamenopause. mRNA reseptor estrogen  $\alpha$  sama-sama terekspresi pada dinding vagina wanita premenopause dan pascamenopause, sedangkan pada wanita premenopause hanya ditemukan mRNA reseptor estrogen  $\beta$  (Arina, 2008).

Reseptor reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  dihasilkan oleh gen yang berbeda. Gen reseptor estrogen  $\alpha$  terletak pada kromosom 6 lokus q25.1, sedangkan gen reseptor estrogen  $\beta$  terletak pada pita q22-24 kromosom. Banyaknya reseptor hormon dipengaruhi oleh konsentrasi hormon di ruang interseluler. Estrogen dapat mempengaruhi ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  melalui peningkatan aktifitas pada dua regio promoter gennya. Akan tetapi, belum diketahui apakah

seluruh promoter lainnya juga dipengaruhi estrogen. Pengaturan mRNA reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  tergantung pada variasi tipe sel dan jaringan. Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan reseptor estrogen tidak hanya dipengaruhi oleh estrogen tetapi juga oleh faktor lain (Arina, 2008).

Volume sekresi vagina normal bervariasi sepanjang siklus estrus. Ketika estrogen rendah, mukosa menjadi tipis dan relatif tidak aktif serta dijumpai sedikit sekresi dan sel endoserviks. Dengan meningkatnya produksi estrogen, sel vagina berproliferasi dan mengelupas lebih cepat, dan sel endoserviks mensekresi lebih banyak mukus. Pada saat ovulasi, dimana produksi estrogen maksimal, mukus serviks sangat banyak dan cair, dan deskuamasi sel vagina berada pada puncaknya (Amran, 2010).

Pada mukosa vagina yang telah matang sempurna, mudah ditemukan 5 jenis sel: (1) sel-sel dari bagian dalam lapisan basalis (dinamakan sel-sel basal), (2) sel-sel dari bagian luar lapisan basalis (dinamakan sel-sel parabasal), (3) sel-sel dari lapisan intermediate, (4) sel-sel yang belum mengalami pertandukan, dan (5) sel-sel yang telah mengalami pertandukan. Dibawah rangsangan estrogen, epitel vagina menjadi lebih tebal, dengan lapisan seluler yang lebih besar. Pertandukan parsial dari sel-sel yang paling luar juga terjadi (Junquiera, et al., 1982).

Sel-sel superfisial yang mengalami pertandukan ditandai oleh inti padat dan mengisut (piknotik) dan sitoplasma asidofil. Sel-sel ini menyolok pada sediaan sekret vagina yang dirangsang estrogen dan memiliki bentuk gepeng karena sel-sel ini merupakan unsur yang paling superfisial dari epitel berlapis gepeng. Gambaran ini demikian khasnya merupakan pengaruh estrogen sehingga

presentase sel-sel asidofil dalam sediaan merupakan indeks yang dapat dipercaya sebagai hasil perangsangan estrogen (Junquiera, et al., 1982).

Sediaan sitologi tidak hanya menunjukkan perubahan-perubahan kuantitatif pada estrogen tetapi juga pengaruh progesteron. Pada siklus menstruasi normal, menjelang hari ke-6 sebagian besar sel-sel berasal dari lapisan intermediate, berbentuk poligonal, dan mengandung sitoplasma basofil. Pada saat ovulasi, dibawah pengaruh estrogen, sebagian besar sel-sel berasal dari lapisan sebelum pertandukan tetapi 20% atau lebih merupakan sel-sel yang telah mengalami pertandukan. Menjelang hari ke-20, selain estrogen dapat diketahui dengan jelas pengaruh progesteron. Terdapat peningkatan jumlah sel-sel yang mengalami deskuamasi dari jenis intermediate. Berbeda dengan gambaran yang nyata dan sel-sel yang terlepas dari fase proliferasi, selama fase sekresi gambaran sel yang lepas dan kelompokkan-kelompokkan dapat dilihat. Hampir semua sel sekali lagi menjadi basofil (Junquiera, et al., 1982). Sifat-sifat pengaruh progesteron lebih jelas berbeda selama kehamilan.

Defisiensi hormon selama menopause menyebabkan epitel vagina menjadi tipis, tanpa disertai sel-sel yang mengalami pertandukan. Sediaan sel vagina terutama sferis, sel-sel basal atau parabasal dengan sitoplasma basofil dengan inti besar memiliki kromatin yang menyebar. Sel-sel basal interna yang berasal dari lapisan epitel vagina yang paling dalam jarang terkelupas. Sel-sel basal interna terlihat pada sediaan sebagai akibat pengelupasan hebat epitel vagina yang terjadi setelah kelahiran yang selanjutnya sebagai akibat penurunan mendadak kadar

hormon plasenta dan ovarium. Sel-sel ini kecil, sferis, dan basofil dan mempunyai inti besar dengan kromatin yang tersebar (Junquiera, et al., 1982).

### 2.6.3 Indeks Maturasi Vagina

Indeks Maturasi (IM) merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengevaluasi hormon yang mempengaruhi hewan betina. IM merupakan pengukuran secara kualitatif terhadap respon estrogen (Amran, 2010). IM dapat dikumpulkan dari vagina, konjungtiva, uretra dan permukaan mukosa bukal. Indeks dibaca dari sel permukaan ke arah dalam dan mengacu pada persen dari skuamosa parabasal, intermediet (pertengahan), dan superfisial (permukaan) yang muncul pada suatu apusan, dengan total dari semua tiga nilai sama dengan 100% (Raden, 2011). Untuk mengetahui efek estrogen dan mengetahui jumlah sel yang matur pada epitel vagina dapat dilihat pada tabel 2.3 sebagai berikut:

**Tabel 2.3** Indeks maturasi sel epitel vagina (Immanuel dkk, 2010)

Indeks Maturasi	Keterangan
0-49	Efek estrogen rendah
50-64	Efek estrogen sedang
65-100	Efek estrogen yang tinggi

Sel parabasal adalah sel yang paling kecil dan paling sedikit dewasa dan mempunyai bentuk bulat seragam dengan inti yang relatif besar. Sel intermediet bersudut banyak dan lebih besar, dengan inti non piknotik yang berukuran lebih besar dari 6 mikrometer. Sel permukaan kebanyakan dewasa dan bersudut banyak. Pola sel yang ditemukan pada apusan normal bervariasi tergantung pada status hormonal betina. Sek skuamosa intermediet banyak ditemukan pada fase luteal

akhir dan folikuler awal siklus estrus. Sel superfisial banyak ditemukan sekitar ovulasi karena pengaruh tingginya hormon estrogen (Amran, 2010).

Indeks maturasi sesuai dengan status hormonal wanita tersebut. Sel skuamosa intermediet banyak ditemukan pada fase luteal akhir dan folikuler awal siklus haid. Sel superfisial banyak ditemukan saat ovulasi karena pengaruh tingginya hormon estrogen. Nilai yang diperoleh dari pengamatan sitologi epitel vagina dikalkulasi dan disajikan dalam rasio P:I:S. Dominasi sel superfisial menunjukkan kuatnya efek estrogen, sedangkan dominasi sel parabasal menunjukkan lemahnya efek estrogen (Amran, 2010).

## 2.7 Tinjauan Mengenai Dosis

Penggunaan dosis didasarkan pada penelitian Fitriyah (2009) dan Kristanti (2010) yang menggunakan pegagan sebagai sediaan untuk hewan betina. Hasilnya menunjukkan bahwa pada dosis yang lebih rendah yakni 75 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 125 mg/kgBB ekstrak pegagan dapat memberi pengaruh terhadap folikel ovarium. Folikel ovarium mengalami perkembangan pertumbuhan seiring meningkatnya dosis perlakuan. Perkembangan jumlah folikel primer, sekunder dan tertier ditemukan pada dosis 75 mg/Kg BB, akan tetapi dalam penelitian ini tidak ditemukan perkembangan folikel hingga mencapai folikel de Graff. Penurunan jumlah folikel primer, sekunder dan tertier terjadi pada dosis 100 mg/Kg BB (Fitriyah, 2009).

Hasil penelitian berikutnya, menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dosis tinggi berpengaruh terhadap perkembangan folikel ovarium mencit (*Mus musculus*) betina. Penelitian ini memperlihatkan

bahwa ekstrak pegagan berpengaruh terhadap penurunan perkembangan folikel primer, sekunder dan tertier pada dosis 125 mg/Kg BB, dan hasil akan semakin turun pada dosis 200 mg/Kg BB, dan 275 mg/Kg BB, dalam penelitian ini tidak ditemukan perkembangan folikel hingga mencapai folikel de Graff (Kristanti 2010).

## 2.8 Mekanisme Dan Peran Bahan Aktif Pegagan dan Beluntas

Allah telah berfirman dalam surat Taaha: 53 mengenai tumbuh-tumbuhan yang baik, sebagaimana berikut:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ  
أَنْوَاعًا مِنْ نَبَاتٍ شَتَّى

*“Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (Q.S. Taaha (20):53)*

Tuhanlah yang menurunkan air hujan dari langit yang menyebabkan tumbuhnya tanam-tanaman dan buah-buahan yang bermacam-macam cita rasanya. Ada yang masam, ada yang manis, bermacam ragam dan jenis dan manfaatnya. Ada yang layak untuk manusia, ada yang baik untuk binatang, yang kesemuanya itu menunjukkan atas besarnya karunia dan banyaknya nikmat yang dilimpahkan Allah kepada semua hamba Nya (Dasuki, et al., 1990). Pegagan dan beluntas memiliki senyawa aktif yang berfungsi sebagai bahan obat maupun keperluan terkait fisiologi hormonal hewan betina (Martono et al., 2010) dan (Utami, et al., 2013).

Rasulullah bersabda “sesungguhnya Allah ta’ala tidaklah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya. Obat itu diketahui oleh orang yang bisa mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa

mengetahuinya” (HR. Ahmad, Ibnu Majah dan al Hakim, beliau menshahihkannya dan disepakati oleh Adz Dzahabi, al Bushiri menshahihkan hadist ini dalam zawa'idnya). “setiap penyakit pasti memiliki obat, bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah Subhanallahu Wata'ala” (HR. Muslim).

Pegagan memiliki kandungan zat kimia yang bermanfaat bagi manusia. Berbagai kandungan kimia yang sudah diketahui antara lain: minyak atsiri, glikosida triterpenoid (asiatikosida, asam asiatat, asam madekasat), tannin, (Martono et al. 2010), centellose, carotenoids (Surbakti, et al., 2003). Berdasarkan hasil analisa diketahui daun beluntas mengandung grup senyawa flavonoid, tannin, sterol, saponin, alkaloid, minyak atsiri, asam amino (leusin, isoleusin, triptofan, treonin) (Susetyarini 2009). Daun beluntas juga mengandung sejumlah senyawa volatile kelompok terpena (Sharma & Goyal, 2011). Senyawa volatil ini merupakan penyusun minyak atsiri yang memberikan aroma khas pada daun beluntas (Puspaningtyas, et al., 2013).

### 2.8.1 Triterpenoid Saponin

Syamsudin (2013) menjelaskan bahwa saponin adalah glukosida dengan ciri khas berbusa. Saponin terdiri dari suatu aglikon polisiklik yang melekat ke salah satu rantai sisi gula. Bagian aglikon yang juga disebut sapogenin bisa jadi steroid (C-27) atau triterpen (C-30). Kemampuan saponin untuk membentuk busa disebabkan oleh kombinasi sapogenin hidrofobik (larut dalam lemak) dan bagian gula hidrofilik (larut dalam air).

Saponin memiliki rasa yang pahit. Beberapa saponin bersifat toksik dan dikenal sebagai sapotoxin. Saponin adalah glikosida *Naturally occurring* yang aktif dipermukaan. Saponin umumnya diproduksi oleh tanaman, namun juga dapat

diproduksi oleh hewan laut dalam dan bakteri. Nama saponin diambil dari kemampuannya untuk membentuk busa stabil seperti sabun di dalam larutan cair (Syamsudin, 2013).

Dahulu sterol dianggap sebagai senyawa satwa (sebagai hormon kelamin, asam empedu, dan lain-lain), namun perkembangan pengetahuan semakin banyak ditemukan dalam jaringan tumbuhan. Fitosterol yang terdapat dalam tumbuhan tingkat tinggi adalah sitosterol (dikenal sebagai  $\beta$ -sitosterol), stigmasterol, dan kampesterol. Fitosterol ini terdapat dalam bentuk bebas sebagai glikosida sederhana berupa triterpen, kerangka dasarnya sistem cincin siklopentana perhidrofenantren (Harborne, 2006).

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon  $C_{30}$  asiklik, yaitu skualena. Triterpenoid dapat dipilah menjadi sekurang-kurangnya empat golongan senyawa: triterpena sebenarnya sebenarnya, steroid, saponin dan glikosida jantung. Kedua golongan yang terakhir sebenarnya triterpena atau steroid yang terutama sebagai glikosida (Harborne, 2006). Bahan aktif triterpenoid saponin telah banyak dikaji. beberapa penelitian menyebutkan bahwa triterpenoid saponin berfungsi dalam efek farmakologi yaitu dapat meningkatkan aktivasi makrofag. Triterpenoid saponin (terutama madekossida) bekerja baik dalam memperbaiki sel dan pembentukan kolagen (Surbakti dan Winarto, 2003).

Dalam kajian fertilitas, komposisi triterpenoid saponin sangat dibutuhkan untuk melindungi sel-sel granulosa. Hal tersebut dikarenakan pada sel-sel granulosa terdapat reseptor-reseptor hormon LH-FSH. Sebagaimana yang

dinyatakan oleh Suheimi (2007), bahwa reseptor FSH hanya ditemukan di sel-sel granulosa yang penting untuk mengendalikan perkembangan folikel. Selain FSH sebagai regulator utama perkembangan folikel dominan, growth faktor yang dihasilkan oleh folikel dapat bekerja melalui mekanisme autokrin dan parakrin, memodulasi kerja FSH, dan menjadi faktor penting yang berpengaruh.

Bahan aktif yang bereaksi pada sel-sel granulosa triterpenoid saponin, selain asiatikosida dan madekosida (Kusumawati, 2007). ovarium akan menghasilkan suatu inhibidin yang menghambat sekresi gonadotropin hormon FSH dan sinyalir hormon LH (Kaneko et al., 2003 dalam Triyanti, 2006). Inhibidin merupakan suatu glikoprotein dimer dimana strukturnya terdiri dari dua subunit polipeptida yaitu  $\alpha$  dan  $\beta$  yang dihubungkan oleh jembatan disulfida (Woodruff dan Pangas, 2000 dalam Kristanti, 2010).

Bahan aktif steroid dan triterpenoid diduga sebagai bahan aktif yang bekerja sebagai faktor antifertilitas. Hal tersebut dikarenakan kedua bahan aktif tersebut diduga mampu mengakibatkan gangguan pada jalur hipotalamus hipofise yang selanjutnya mengakibatkan gangguan sekresi GnRH yang kemudian akan berpengaruh terhadap pembentukan, perkembangan dan pematangan folikel (Limbong, 2007). Pada folikel sekunder terbentuk membran granulosa yang terdiri dari sel-sel granulosa dan mulai mensekresikan cairan folikel. Sel-sel granulosa adalah epitel origin yang esensial untuk pertumbuhan dan survival oosit (Triyanti, 2006).

Secara normal kadar hormon estradiol yang dihasilkan sangat tergantung pada folikel di ovarium yang diperlukan untuk terjadinya ovulasi, jika

perkembangan folikel berlangsung normal maka akan dihasilkan kadar hormon yang normal juga. Sebaliknya jika selama proses perkembangan folikel terganggu, maka folikel menjadi atretik yang akan mempengaruhi kadar hormon estrogen yang terbentuk. Hal ini sangat tergantung pada besarnya gangguan yang terjadi selama proses perkembangan folikel (Andria 2012).

Triterpenoid saponin mengandung steroid yaitu diosgenin atau yang sering disebut dengan genin. Genin dapat diubah menjadi progesteron melalui proses kimia yang disebut penguraian maker yang menghasilkan testosteron dan estradiol. Progesteron dibentuk dari pregnenolon melalui penghilangan atom hydrogen dari C3 dan pergeseran ikatan ganda dari cincin B pada posisi 5-6 ke cincin A pada posisi 4-5, perubahan ini oleh adanya bantuan enzyme  $3\beta$  hidroksi dehidrogenase dan  $\Delta^{4-5}$  isomerase, selanjutnya dengan bantuan enzyme  $17\alpha$  hidroksilase, progesteron akan diubah menjadi 17 hidroksi progesteron yang kemudian mengalami demolase menjadi bentuk testoteron, yang selanjutnya testosteron mengalami aromatisasi (pembentukan gugus hidroksi fenolik pada atom C3) menjadi estradiol (E2) (Andria 2012).

Kadar estradiol yang tinggi akan menghambat (inhibin) hipofisis anterior dengan umpan balik negatif, sehingga hormon FSH dan LH tidak dikeluarkan oleh hipofisis anterior, maka hal ini akan mengganggu proses perkembangan sel folikel ovarium, sehingga kadar estradiol menjadi menurun dan ovulasi tidak terjadi, maka tidak terbentuklah korpus luteum yang berfungsi untuk mensekresikan hormon progesteron (Andria 2012).

Kandungan dari triterpenoid saponin selain asiatikosida terdapat juga madekosida dan asam asiatik. Asam asiatik diduga bersifat sitotoksik bila kadarnya dalam darah berlebihan akan menyebabkan apoptosis sel pada folikel ovarium. Apoptosis sel pada folikel yang terjadi akibat asam asiatik dimulai dengan rusaknya mitokondria sehingga sitokrom C akan terdisosiasi dari membran mitokondria. Akibatnya permukaan sel akan menggelembung seperti balon dan kromatin (DNA bersama proteinnya) mengalami degradasi. Protein yang dihasilkan mirip dengan protein Bcl 2 yang menyebabkan sel meningkatkan produksi Bcl 2 sendiri, hal ini membuat sel menjadi rentan terhadap apoptosis. Protein Bcl 2 terdapat pada sel granulosa yang dapat mengakibatkan folikel atresia (Andria 2012).

Atresia folikel mengakibatkan berhentinya mitosis pada sel granulosa. Sebagaimana dilaporkan Fitriyah (2009) pada penelitiannya, yakni dengan memperlihatkan bahwa ekstrak daun pegagan terhadap perkembangan folikel ovarium pada mencit didapatkan hasil bahwa. Pada dosis 75 mg/KgBB terjadi peningkatan jumlah folikel primer, sekunder dan tertier. Akan tetapi dengan dosis 100 mg/KgBB, dan 125 mg/KgBB, tidak ditemukannya folikel hingga mencapai folikel de graff. Besar kemungkinan hal tersebut dikarenakan jumlah zat aktif yang terkandung dalam dosis memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium.

Pada hewan betina, gonadotrophin releasing hormone (GnRH) disekresikan dari hipotalamus merangsang pelepasan lutenising hormone (LH) dan follicle stimulating hormone (FSH) dari pituitari anterior. FSH and LH

disekresikan dengan taraf yang berbeda pada periode siklus estrus. Pada awal siklus (fase follicular), FSH merangsang perkembangan folikel-folikel, salah satu diantaranya berkembang cepat menjadi folikel de Graff (GF). Folikel de Graaf mensekresikan hormon estradiol (Hernawati, 2011).

### 2.8.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bertanggung jawab atas pigmen warna pada bunga, buah dan kadang-kadang pada daun. Senyawa chalcones dan flavonols, memberi efek warna kuning. Flavonoid memiliki peranan yang sangat besar pada pembentukan pigmen tanaman. Senyawa flavonoid dapat melindungi tanaman dari bahaya sinar UV serta berperan dalam menarik hewan yang akan membantu penyerbukan tanaman (Padua et al, 1999).

Flavonoid merupakan senyawa seperti flavon, biasanya memiliki aktivitas antioksidan dan kadang-kadang anti-inflamasi. Flavonoid berfungsi untuk menangkap radikal bebas dengan membentuk suatu radikal stabil yang bisa bereaksi dengan radikal flavonid lain sehingga menghasilkan dua non-radikal. Bahan aktif utama untuk nutasetikal di dalam tanaman adalah flavonoid. Karena sifatnya yang khas untuk senyawa fenol, flavonoid bisa bertindak sebagai antioksidan yang kuat dan *chelator* logam. Flavonoid juga telah lama diketahui mengandung khasiat antiinflamasi, antialergi, hepatoreaktif, antitrombosis, antivirus dan antikarsinogenik (Syamsudin, 2013).

Struktur dasar dari senyawa flavonoid adalah 2-phenyl kromat atau Ar-C3-Ar skeleton. Senyawa ini merupakan derivad dari kombinasi asam shikimic dan asam asetat (Padua et al, 1999). Menurut Syahnida (2003) dalam Hasanah

(2009) menyatakan semua flavonoid menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon. Flavonoid banyak ditemukan dalam bentuk tepung putih padatumbuhan primula contohnya pada tanaman beluntas dan biasanya terdapat pada vakuola sel. Pada bidang farmakologi flavonoid dapat digunakan sebagai anti-radang, antibody, anti-tumor, anti-HIV, anti-diare, anti-oksidan, meningkatkan imunoglobulin, mengurangi kerapuhan pembuluh kapiler. Biasanya dalam cincin heterosiklik, dan bersifat aktif biologis.

### **2.8.5 Fitosterol**

Fitosterol dan fitostanol merupakan suatu kelompok senyawa yang ditemukan khusus pada tanaman. Secara struktur, fitosterol berkaitan dengan kolesterol namun berbeda dari kolesterol dari segi struktur rantai sisi. Fitosterol mengandung suatu kerangka steroid dimana suatu kelompok hidroksil melekat ke atom C-3 pada ring-A dan rantai sisi alifatik melekat ke atom C-17 pada ring-D. Sterol memiliki suatu ikatan rangkap dua, khususnya antara C-5 dan C-6, sementara ikatan ini jenuh di dalam fitostanol (Saifudin, 2011).

Fitosterol adalah molekul seperti kolesterol yang ditemukan di seluruh tanaman, dimana konsentrasi tertinggi ditemukan di dalam minyak sayur. Fitosterol diserap hanya dalam jumlah yang sangat kecil namun dapat menghambat absorpsi kolesterol oleh usus, termasuk kolesterol bilier endogen. Esterifikasi fitosterol dengan asam lemak rantai panjang dapat meningkatkan daya larut di dalam lemak hingga 10 kali lipat dan membantu transportasi beberapa makanan berlemak (Syafudin, 2011).

$\beta$ -sitosterol merupakan salah satu dari beberapa phytosterol (sterol pada tanaman) yang memiliki struktur kimia yang sama dengan struktur kolesterol. Sitosterol adalah bubuk putih seperti lilin dan memiliki bau khas. Sitosterol bersifat hidrofobik dan larut di dalam alkohol. Baik tersendiri maupun bersamaan dengan phytosterol yang sama,  $\beta$ -sitosterol dapat mengurangi kadar kolesterol di dalam darah dan kadang-kadang digunakan dalam mengobati hiperkolesterolemia.  $\beta$ -sitosterol menghambat absorpsi kolesterol di dalam usus (Syaifudin, 2008).

Setelah diserap di dalam usus, sterol akan diangkut lipoprotein dan digabungkan ke dalam membran sel. Phytosterol dan phytostanol sama-sama menghambat pengambilan kolesterol bilier maupun kolesterol makanan, sehingga kadar kolesterol LDL kolesterol total di dalam serum berkurang. Karena struktur  $\beta$ -sitosterol sangat mirip dengan struktur kolesterol, maka  $\beta$ -sitosterol mengambil posisi kolesterol makanan dan bilier di dalam micelle yang diproduksi di dalam lumen usus. Hal ini menyebabkan penurunan absorpsi kolesterol di dalam tubuh (Syamsudin, 2013).

### **2.8.3 Tannin**

Tannin merupakan suatu istilah fungsional, bukan sebuah kelompok zat kimia. Tannin digunakan untuk menyamak dan melindungi kulit sejak abad ke-18. Tannin adalah polifenolik yang memberikan rasa pahit kepada cranberry dan pomegranate. Bersama dengan vitamin C, tannin membantu membangun dan memperkuat kolagen. Tannin mencegah infeksi saluran kemih dengan mencegah melekatnya bakteri ke dinding saluran kemih. Kombinasi tannin dengan

anthocyanin dapat memecah kolesterol yang telah dioksidasi di dalam aliran darah (Syamsudin, 2013).

Tanin memiliki struktur kimia yang kompleks. Tanin banyak ditemukan pada tumbuhan yang berpembuluh. Tanin merupakan senyawa fenolik larut air dengan BM 500-3000, memberikan reaksi umum senyawa fenol, dan memiliki sifat-sifat khusus seperti pretisipasi alkaloid, gelatin dan protein-protein lain. Di dalam tumbuhan, tanin terletak terpisah dengan protein dan enzim sitoplasma. Bila jaringan rusak, maka reaksi penyamakan dapat terjadi. Reaksi ini dapat menyebabkan protein lebih sukar dicapai oleh cairan pencernaan hewan. Sebagian tumbuhan yang bertanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya yang sepat (Harborne, 2006).

Tanin biasanya berupa senyawa amorf, higroskopis yang berwarna coklat kuning yang dapat larut dalam air, terutama air panas, membentuk larutan koloid bukan larutan sebenarnya. Makin murni tanin, maka kurang kelarutannya dalam air dan makin mudah membentuk kristal. Tanin juga larut dalam pelarut organik yang polar, seperti benzena dan kloroform. Larutan tanin dapat diendapkan dengan penambahan asam mineral atau garam. Beberapa tanin terbukti mempunyai aktivitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti reserve transkriptase dan DNA topoisomerase (Robinson, 1991).

Dari hasil penelitian Lusiyawati (2008) dalam Rukmana (2010) menyatakan bahwa tanin mampu mempengaruhi kualitas spermatozoa, karena tanin bersifat chelator yaitu substansi yang mampu mengikat partikel ion, antara lain mampu

mengikat enzim-enzim kunci pada sintesis protein, menggumpalkan protein dan pembentukan senyawa kompleks dengan fosfat energi tinggi, sehingga fosfat di dalam tubuh menjadi tidak aktif. Hal ini mengakibatkan energi metabolisme menurun dan kualitas nutrisi yang diperlukan semen juga akan berkurang sehingga kualitas sperma yang meliputi motilitas dan viabilitas akan menurun dan abnormalitas serta mortalitas akan meningkat.

#### **2.8.4 Lignan**

Lignan merupakan sekelompok senyawa kimia yang ditemukan pada tanaman. Lignan adalah salah satu kelas phytoestrogen, yang merupakan zat kimia seperti estrogen dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Kelas phytoestrogen lainnya adalah isoflavon dan kumestan. Lignan tanaman adalah zat polifenol yang diperoleh dari fenilalanin melalui dimerisasi alkohol sinamat, yang juga dikenal sebagai monolignol, dan menjadi kerangka dibenzylbunat. Reaksi ini dikatalisasi oleh enzim oksidatif dan seringkali dikontrol (Syaifudin, 2013).

#### **2.8.6 Asiatikosida**

Asiatikosida diketahui dapat mempercepat penyembuhan luka dengan jalan meningkatkan kandungan hidrosiprolin dan mukopolisakarida, meningkatkan sintesa kolagen, angiogenesis, epitelisasi dan meningkatkan sintesa matriks ekstra seluler. Asam asiatik merupakan bagian dari Asam asiatik bersifat antiseptik sebagai antibakteri dan antijamur. Selain itu asam asiatik juga memiliki efek antioksidan dan perlindungan terhadap radikal bebas, neuroprotektor serta menginduksi apoptosis pada hepG2 sel hepatoma. Apoptosis sel pada folikel yang terjadi akibat asam asiatik dimulai dengan rusaknya mitokondria sehingga

sitokrom C akan terdisosiasi dari membran mitokondria. Akibatnya permukaan sel akan menggelembung seperti balon dan kromatin (DNA bersama proteinnya) mengalami degradasi. Protein yang dihasilkan mirip dengan protein Bcl 2 yang menyebabkan sel meningkatkan produksi Bcl 2 sendiri, hal ini membuat sel menjadi resisten terhadap apoptosis (Kusumawati, 2007).



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium (*experimental research*) tentang pengaruh ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan beluntas (*Pluchea indica*) terhadap siklus estrus yang ditunjukkan dengan perubahan panjang fase diestrus, serta mengenai proliferasi epitel vagina yang ditunjukkan dengan nilai indeks maturasi sel dan tebal epitel vagina tikus (*Rattus norvegicus*) betina. Desain penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas 6 perlakuan beberapa dosis ekstrak daun pegagan dengan 4 kali ulangan.

#### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai September 2015. Aklimatisasi dilakukan selama 7 hari, dilanjutkan dengan penyerentakan siklus estrus dengan pemberian prostaglandin PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . 3 hari kemudian dilanjutkan dengan perlakuan selama 15 hari atau 3 kali siklus (Malole & Pramono, 1989). Pembuatan ekstrak dilaksanakan di laboratorium kimia organik, jurusan kimia. Pemeliharaan dan perlakuan dilaksanakan di laboratorium biosistematik, pembedahan di laboratorium fisiologi hewan dan pengamatan preparat di laboratorium optik jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkontrol, sebagaimana berikut:

- a. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol dan variasi dosis ekstrak daun beluntas dan pegagan yang terdiri dari yakni 25 mg ekstrak daun pegagan dan 25 mg ekstrak daun beluntas per kg BB, begitupula untuk dosis 50mg/kg BB, 75mg/kg BB, 125mg/kg BB dan 200mg/kg BB.
- b. Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah panjang fase diestrus, indeks maturasi epitel dan tebal epitel vagina.
- c. Variabel terkontrol dalam penelitian ini merupakan tikus (*Rattus norvegicus*) betina fertil galur wistar yang diberi pakan pelet jenis SP dan diberi minum secara *ad libitum*.

### 3.4 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) betina yang berumur  $\pm 2$  bulan, berat badan 120-150 gram dari galur Wistar. Besar sampel yang digunakan adalah sekitar 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4ekor tikus sebagai ulangan.

### 3.5 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi kandang pemeliharaan, sonde lambung yang dimodifikasi dari spuit 3 ml yang ujung tajamnya ditambah dengan bentukan bundar (Kusumawati, 2004), timbangan analitik, penyaring buchner, rotary evaporator vacum, seperangkat alat gelas, mikroskop binokuler Nikon E 100,

deck glass, *objectglass*, pipet tetes kecil, spuit 1 ml, labu ukur 100 ml, gelas ukur 10 ml, beaker glass 50 ml, beaker glass 500 ml, Erlenmeyer 500 ml, pengaduk gelas, *hot plate*, papan seksi, pot merah, objek glass, deck glass, kaset cetakan, *tissue processor*, *tissue embedding*, *microtome*, dan *water bath*.

Bahan-bahan yang akan digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar betina usia  $\pm$  2 bulan dengan berat badan 120-150 gram yang diperoleh dari peternak sekitar daerah Malang, serbuk gergaji, pelet jenis SP, serbuk simplisia daun pegagan dan beluntas yang diperoleh dari Balai Materia Medika Batu buatan tahun 2014, hormone prostaglandin (PGF $2\alpha$  (Capriglandin), Na CMC 0,5%, aquadest, cloroform, ethanol 70%, air pipa, pewarna giemsa, formalin 10%, parafin, *running tap water*, xylene, meyer hematoshirine dan eosin stain.

### 3.6 Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus sebagai ulangan. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut:

- a. Kelompok I (kontrol) : tikus diberikan 2,5 ml Na CMC 0,5%
- b. Kelompok II : tikus diberi perlakuan ekstrak daun pegagan dosis 25 mg/kg BB + ekstrak beluntas 25 mg/kg BB + 2,5 ml Na CMC 0,5%
- c. Kelompok III : tikus diberi perlakuan ekstrak daun pegagan dosis 50 mg/kg BB + ekstrak beluntas 50 mg/kg BB + 2,5 ml Na CMC 0,5%
- d. Kelompok IV : tikus diberi perlakuan ekstrak daun pegagan dosis 75 mg/kg BB + ekstrak beluntas 75 mg/kg BB + 2,5 ml Na CMC 0,5%

- e. Kelompok V : tikus diberi perlakuan ekstrak daun pegagan dosis 125 mg/kg BB + ekstrak beluntas 125 mg/kg BB + 2,5 ml Na CMC 0,5%
- f. Kelompok VI : tikus diberi perlakuan ekstrak daun pegagan dosis 200 mg/kg BB + ekstrak beluntas 200 mg/kg BB + 2,5 ml Na CMC 0,5%

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Persiapan Hewan Coba dan *Run Down* Penelitian

Persiapan hewan coba dan *rundown* penelitian dilakukan sebagaimana berikut:

1. Tikus yang digunakan adalah tikus galur Wistar berumur  $\pm$  2 bulan dengan jumlah 24 ekor.
2. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari sebelum perlakuan di kandang dengan fotoperiode 11-12 jam siklus gelap terang pada suhu kamar (20-25°C).
3. Selama proses aklimatisasi sampai perlakuan, tikus diberi makan pellet kode SP dan diberi minum secara *ad libitum* (berlebih) setiap hari.
4. Setelah aklimatisasi, ditimbang berat badan tikus dan dilakukan pengelompokan sesuai kode kandang kelompok perlakuan dengan distribusi tikus dengan berat badan secara acak.
5. Tikus yang siap digunakan untuk proses penelitian adalah dengan kisaran berat badan 120-150 gram.
6. Tikus yang digunakan berjumlah 24 ekor dari 30 tikus untuk penelitian
7. Dilakukan penyerentakan siklus birahi dengan injeksi prostaglandin (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) 0.01ml tiap ekor

8. Setelah 3 hari terhitung sejak injeksi dilakukan pemeriksaan siklus estrus melalui metode ulas vagina
9. Apabila tikus telah masuk fase estrus maka langsung dikelompokkan ke dalam kelompok perlakuan dan segera dilakukan perlakuan pencekohan dengan dosis yang telah ditentukan
10. Pencekohan dilakukan selama 15 hari untuk setiap individu, selama perlakuan dilakukan pemeriksaan siklus dengan ulas vagina
11. Pada hari ke-16, tikus dibedah dan diambil vaginanya, untuk dibuat preparat histologi, untuk mengetahui proliferasi epitel vagina.

### **3.7.2 Penyerentakan Siklus Birahi**

Sebelum diberikan perlakuan dilakukan penyerentakan birahi, karena hewan coba yang digunakan berjenis kelamin betina yang cenderung dipengaruhi oleh siklus birahi. Injeksi maksimal untuk intramuscular pada tikus adalah 0,1 ml (Kusumawati, 2004). Penyerentakan dilakukan dengan memberikan hormon prostaglandin sebanyak 0,5mg yang diinjeksikan sebanyak 0,1ml yang secara intramuscular (Nadhifah, 2010). Penggunaan prostaglandin berfungsi meregresi corpus luteum, sehingga fase luteal akan berhenti dan dilanjutkan dengan fase folikular.

Prostaglandin yang diberikan pada tikus adalah sesuai dengan dosis yang tertera pada botol yakni 11 mg/2 ml atau 5,5 mg/ml, dengan pemberian sebanyak 0,5 ml pada babi. Untuk memperoleh dosis absolut pada tikus, maka dihitung perbandingan berat badan tikus dengan babi. Sehingga diperoleh dosis pemberian pada tikus sebanyak 0,01ml per ekor. Oleh karena itu, dilakukan pengenceran 1ml

larutan prostaglandin pada 10ml aquadest sehingga diperoleh 0,01ml prostaglandin dalam 0,1ml larutan injeksi, karena injeksi intramuscular maksimal pada tikus adalah 0,1ml (Kusumawati, 2004).

### **3.7.3 Pembuatan Ekstrak Pegagan dan Beluntas**

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara serbuk daun pegagan dan daun beluntas yang telah halus dimaserasi dengan pelarut ethanol 70% selama 24 jam. Serbuk yang telah dimaserasi disaring menggunakan corong buchner. Filtrat yang telah diperoleh dipekatkan menggunakan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang dihasilkan disimpan pada suhu 4-5°C untuk selanjutnya digunakan pada perlakuan.

### **3.7.4 Penentuan Dosis Ekstrak**

Merujuk kepada penelitian terdahulu yakni Fitriyah (2009) yang menggunakan dosis kecil sebanyak 75mg/kg BB sebagai dosis terkecil dapat memberikan pengaruh positif terhadap perkembangan folikel, dan dosis 125mg/kgBB sebagai dosis tertinggi telah menurunkan jumlah folikel yang berkembang. Sedangkan dosis yang digunakan Kristanti (2010) berupa 125mg/kgBB, 200mg/kgBB dan 275mg/kgBB telah bekerja baik sebagai antifertilitas dengan mencegah perkembangan folikel.

Untuk mendapatkan dosis absolut tikus menggunakan tabel Luas Permukaan (Kusumawati, 2004). Dosis absolut pada tikus diperoleh dengan cara menghitung berat badan (kg) x dosis, Semisal  $0.120 \text{ kg} \times 25 = 3 \text{ mg}$ . Sedangkan kapasitas volume pemberian peroral tikus per ekor maksimal sebanyak 5 ml (Kusumawati, 2004). Maka dilarutkan 3 mg ekstrak kedalam 2,5ml 0,5% NaCMC. Cara

perhitungan demikian dilakukan untuk setiap dosis perlakuan disesuaikan dengan masing-masing berat badan tikus.

### **3.7.5 Pembuatan Larutan NaCMC**

Sediaan larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan menaburkan 7500 mg Na CMC kedalam 150 ml aquadest panas, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquadest hingga volume 1500 ml.

### **3.7.6 Pemberian Perlakuan**

Kombinasi ekstrak pegagan dan beluntas diberikan secara oral sebanyak 2,5ml dengan menggunakan spuit 3 ml setelah 3 hari injeksi hormon prostaglandin. Pemberian ekstrak dilakukan setiap hari pada pukul 10.00-11.00 WIB selama 18 hari sesuai dosis yang telah ditentukan.

### **3.7.7 Metode Ulas Vagina**

Pembuatan preparat ulas vagina dilakukan untuk identifikasi dimulainya siklus estrus. Sampel diambil setiap hari pada pukul 09.00-10.00 WIB. Pengambilan sampel menggunakan cotton bud yang telah dicelupkan larutan NaCl fisiologis, lalu dimasukkan ke dalam vagina tikus betina dan diputar sebanyak 3 kali. Hasil ulasan digoreskan pada objek glass dan dikering anginkan selama 3 menit, ditetesi larutan Giemsa, didiamkan selama 30 menit dan dibilas dengan air yang mengalir, lalu dikering anginkan.

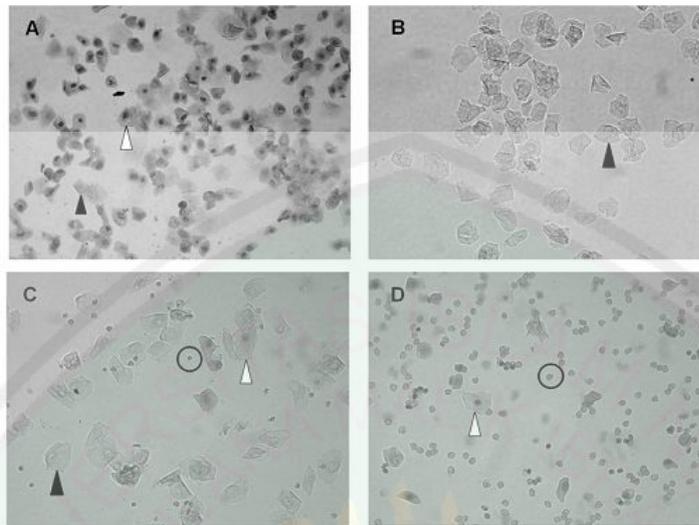
### 3.7.8 Penentuan Siklus Estrus

Sediaan ulas vagina yang telah diwarnai ditentukan fase siklus estrusnya melalui identifikasi morfologi sel epitel. Hasil preparat apusan vagina diamati dibawa mikroskop dengan perbesaran 100x dan dicatat fase-fase pada setiap preparat masing-masing tikus. Untuk menentukan tahapan deteksi siklus estrus dapat dilakukan dengan teknik *papsmear* (ulas vagina), dengan melihat gambaran epitel vaginanya sehingga dapat dibedakan menjadi proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Partodiharjo, 1992). Penentuan fase pada siklus estrus dengan melihat perbandingan sel epitel berinti, sel epitel menanduk (kornifikasi), dan leukosit pada hasil apusan vagina (Sitasiwi, 2009). Perbandingan jenis sel pada preparat ulas vagina dan tahapan fase pada siklus estrus dituangkan pada Tabel dan Gambar berikut.

**Tabel 3.1** Perbandingan jenis sel pada preparat ulas vagina pada setiap fase siklus estrus (Baker *et al*, 1980).

Fase Siklus Birahi	Ulasan Vagina
Proestrus	Sel epitel berinti $\pm$ 75% Sel kornifikasi (sel tanduk) $\pm$ 25%
Estrus	Sel kornifikasi $\pm$ 75% Sel pavement (menumpuk) $\pm$ 25%
Fase siklus birahi	Ulasan vagina
Metestrus	Sel pavement 100% Sel pavement dan leukosit
Diestrus	Leukosit 100% Leukosit dan sel berinti mulai muncul

### Gambar Pengamatan Siklus Estrus Mencit dengan Apusan Vagina



Gambar 3.1: Sitologi setiap fase pada siklus estrus. Tiga tipe sel yang teridentifikasi Leukosit (lingkaran), sel epitel kornifikasi (segitiga hitam) dan sel epitel berinti (segitiga putih). Fase estrus terdiri atas (A) proestrus, (B) Estrus, (C) Metestrus dan (D) Diestrus (Byers et al. 2012).

Keterangan apusan vagina didasarkan dari Byers et al (2012) dan Nursyah (2012) yang disimpulkan dari Baker et al . (1980); Smith dan Mangkoewidjojo (1988); dan Turner dan Bagnara (1988) sebagaimana:

1. Fase proestrus dapat diketahui dengan adanya dominasi sel-sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau bertumpuk (berlapis-lapis), disertai dengan adanya sel epitel kornifikasi. Fase proestrus berlangsung selama kira-kira 12 jam.
2. Fase estrus ditandai dengan adanya sel-sel epitel kornifikasi yang banyak pada lumen vagina dan berlangsung selama 12 jam, apabila tidak terjadi kehamilan maka akan berlanjut ke fase metestrus.
3. Fase metestrus dapat diketahui dengan adanya sel epitel kornifikasi dan sel-sel leukosit, beberapa sel epitel berinti juga nampak muncul pada akhir

fase. Fase metestrus berlangsung selama 21 jam, dibagi menjadi 2 stadium yaitu stadium 1 kira-kira 15 jam dan stadium 2 kira-kira berlangsung selama 6 jam.

4. Fase diestrus adalah fase yang paling lama dari setiap fase, lebih dari 2 hari. Hasil ulasan vagina didominasi sel leukosit, dan di akhir fase mulai nampak sel epitel berinti. Fase diestrus berlangsung selama 60-70 jam.

Kriteria penentuan siklus estrus berdasarkan gambaran perubahan bentuk epitel vagina (Nalley, dkk, 2011) :

**Tabel 3.2** kriteria perubahan bentuk sel epitel vagina (Nalley, dkk, 2011)

No	Sel epitel	Bentuk sel	Fase
1	Sel Parabasal (Leukosit)	Sel kecil, bulat dengan inti besar	Diestrus
2	Sel Intermediat (Epitel berinti)	Sel lebih besar daripada sel parabasal dengan inti yang lebih kecil	Diestrus - Proestrus
3	Sel Superfisial (Epitel kornifikasi)	Sel besar, berbentuk poligonal inti yang sangat kecil atau tanpa inti	Proestrus - Estrus

### 3.8 Pengambilan Data

#### 3.8.1 Pembedahan dan Pengambilan Vagina

Pembedahan hewan coba dan pengambilan vagina dilakukan setelah pengecekan siklus estrus dan setelah pemberian perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas selama 18 hari. Pengecekan siklus estrus bertujuan untuk memastikan keseragaman fase diestrus agar dapat dilakukan perbandingan histologi vagina normal dengan vagina yang diberi perlakuan. Pada saat dibedah, semua tikus dalam fase diestrus.

Langkah yang dilakukan untuk pembedahan adalah sebagai berikut:

1. Hewan coba dieksekusi dengan dislokasi pada bagian leher
2. Dilakukan pembedahan secara vertikal dari daerah abdomen posterior menuju anterior dengan membuka daerah rongga perut dan rongga dada.
3. Vagina bersama uterus dan ovarium diambil dan dicuci dengan aquades dan PBS
4. Hasil yang diperoleh kemudian dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan

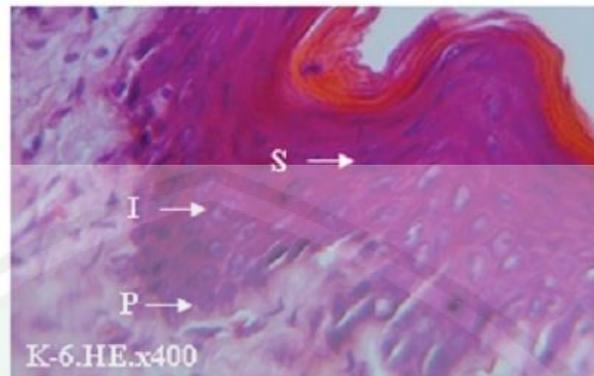
### **3.8.2 Pembuatan Preparat Histologi Vagina**

Sampel dinding vagina yang sudah diambil, dilakukan pemeriksaan histologist untuk melihat penebalan epitel vagina. Pada pengamatan mikroskopis sayatan dinding vagina dengan pewarnaan Hematoksin eosin (Raden, 2011). Berikut ini langkah pembuatan preparat vagina:

1. Tahap Fiksasi, ovarium difiksasi pada larutan formalin 10% selama 1 jam, diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda.
2. Tahap Dehidrasi, vagina yang telah difiksasi kemudian didehidrasi pada larutan ethanol 70 % selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan ethanol 80%, dilanjutkan kedalam larutan ethanol 95 % sebanyak 2 kali dan dalam ethanol absolut selama 1 jam dan diulang sebanyak 2 kali pada ethanol absolut yang berbeda.
3. Tahap Clearing (Penjernihan), vagina yang telah didehidratasi kemudian diclearing untuk menarik kadar ethanol dengan menggunakan larutan xylene I selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke larutan xylene II selama 1,5 jam.

4. Tahap Embedding, vagina dimasukkan kedalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu 60°C, kemudian paraffin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama  $\pm$  1 jam.
5. Tahap Sectioning (pemotongan ), vagina yang sudah mengeras dilepaskan dari kaset dan dipasang pada mikrotom kemudian dipotong setebal 5 micron dengan pisau mikrotom.
6. Hasil potongan dimasukkan ke dalam water bath bersuhu 40°C untuk merentangkan hasil potongan, hasil potongan kemudian diambil dengan object glass dengan posisi tegak lurus dan dikeringkan.
7. Tahap Staining (Pewarnaan), hasil potongan diwarnai dengan hematoxilin eosin (pewarnaan HE) melalui tahapan sebagai berikut :
  - a. Preparat direndam dalam larutan xylene I selama 10 menit.
  - b. Preparat diambil dari xylene I dan direndam dalam larutan xylene II selama 5 menit.
  - c. Preparat diambil dari xylene II dan direndam dalam ethanol absolut selama 5 menit.
  - d. Preparat diambil dari ethanol absolut dan direndam dalam ethanol 96% selama 30 detik.
  - e. Preparat diambil dari ethanol 96% dan direndam dalam ethanol 50% selama 30 detik.
  - f. Preparat diambil dari ethanol 50% dan direndam dalam running tap water selama 5 menit.

- g. Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam meyer hematoshirin selama 1-5 menit.
- h. Preparat diambil dari larutan meyer dan direndam dalam running tap water selama 2-3 menit.
- i. Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam pewarna eosin selama 1-5 menit.
- j. Preparat diambil dari larutan eosin kemudian dimasukkan dalam ethanol 75 % selama 5 detik, kemudian dimasukkan ke dalam ethanol absolute selama 5 detik diulang 3 kali pada ethanol absolut yang berbeda.
- k. Preparat diambil dan direndam dalam xylene III selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam xylene IV selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam xylene V selama 10 menit.
- l. Preparat diangkat dan dikeringkan.
- m. Preparat ditutup menggunakan deckglass
- n. hasil preparat yang sudah dibuat dibandingkan dengan literatur. Atrofi pada hewan coba dapat diamati pada histologi dinding vagina yang tinggal lapisan epitel sel parabasal. Preparat diamati dengan perbesaran 400x (Raden, 2011).



Gambar 4: Gambaran lapisan epitel dinding vagina pada tikus normal. Keterangan: Menunjukkan susunan epitel penyusun pada vagina hewan coba normal P: sel parabasal, I : intermediate, S: superfisial (HE,x400)

### 3.9 Pengolahan Data

Data jumlah siklus estrus yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *one way ANNOVA*. Apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka dilakukan uji lanjut dengan uji duncan (*Duncan test*) 0,05. Sedangkan gambaran panjang siklus estrus disajikan secara diskriptif dalam bentuk grafik. Ketebalan epitel vagina dihitung dengan menggunakan aplikasi Image Raster dimulai dari tepi lumen. Hal ini diulang sampai 8 kali lapang pandang pada 1 gambar preparat yang bagus per kelompok perlakuan. Kemudian, data tebal epitel vagina yang diperoleh di uji dengan evaluasi maturasi sel dengan cara menghitung jumlah sel parabasal (PB), sel Intermediet (I), sel superfisial (S) dan ditampilkan dalam rasio PB:I:S (Raden, 2011). Evaluasi maturasi sel dihitung di bawah mikroskop dengan menghitung perbandingan sel parabasal, intermediet, dan superfisial dalam satu lapang pandang. Hal ini diulangi sampai 8 lapang pandang dalam 1 preparat. Jumlah sel parabasal kemudian dikalikan 0, jumlah sel intermediet dikalikan 0,5, dan

jumlah sel superfisial dikalikan 1. Ketiganya lalu dijumlah, diperoleh hasil untuk jumlah sel yang matur (Immanuel, et al, 2010).

Tabel 3.3 Indeks maturasi sel epitel vagina (Immanuel dkk, 2010)

Indeks Maturasi	Keterangan
0-49	Efek estrogen rendah
50-64	Efek estrogen sedang
65-100	Efek estrogen yang tinggi

Data indeks maturasi per perlakuan dianalisis dengan SPSS. Data hasil analisis sel dikelompokkan berdasarkan fase siklus estrus dan ditabulasi dalam persentase (0% - 100%), kemudian dianalisis secara deskriptif (Nalley dkk, 2011).

Gambaran sel yang diperoleh didokumentasi menggunakan mikroskop kamera.

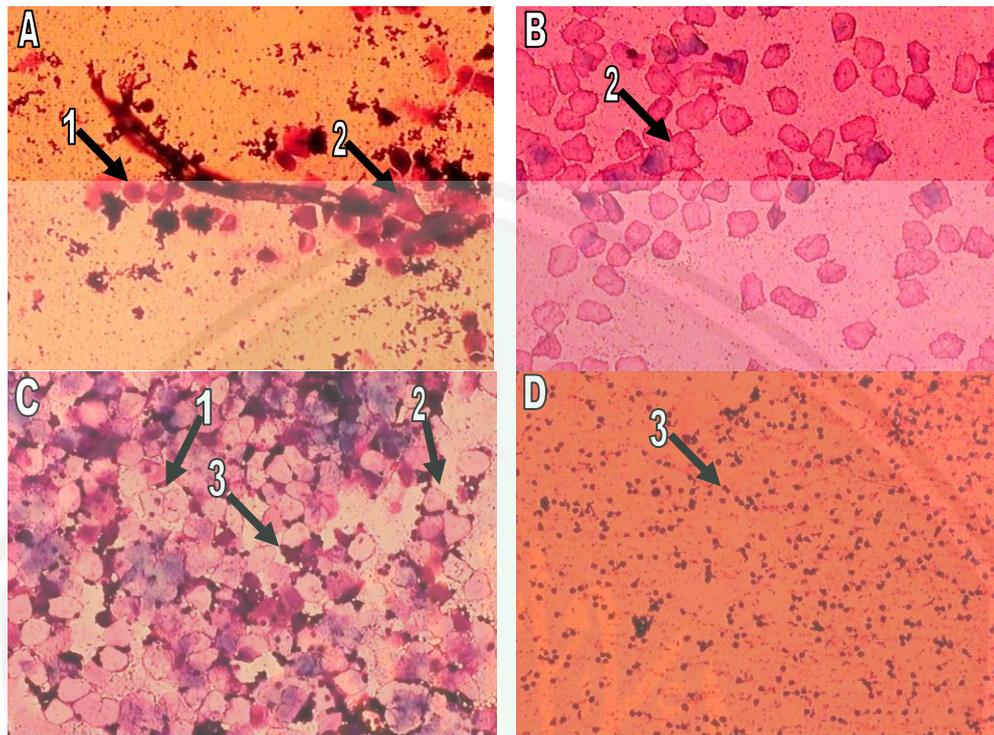
## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap Panjang Fase Diestrus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina

Hewan betina terutama pada mamalia memiliki siklus reproduksi yang berbeda-beda, siklus reproduksi tersebut dapat diamati berdasarkan perubahan fisiologis yang terjadi. Siklus reproduksi pada mamalia disebut dengan siklus estrus. Siklus estrus terdiri dari empat fase yakni fase proestrus, fase estrus, fase metestrus dan fase diestrus. Perubahan setiap fase pada siklus estrus dapat diamati dengan metode ulas vagina (Yatim, 1994).

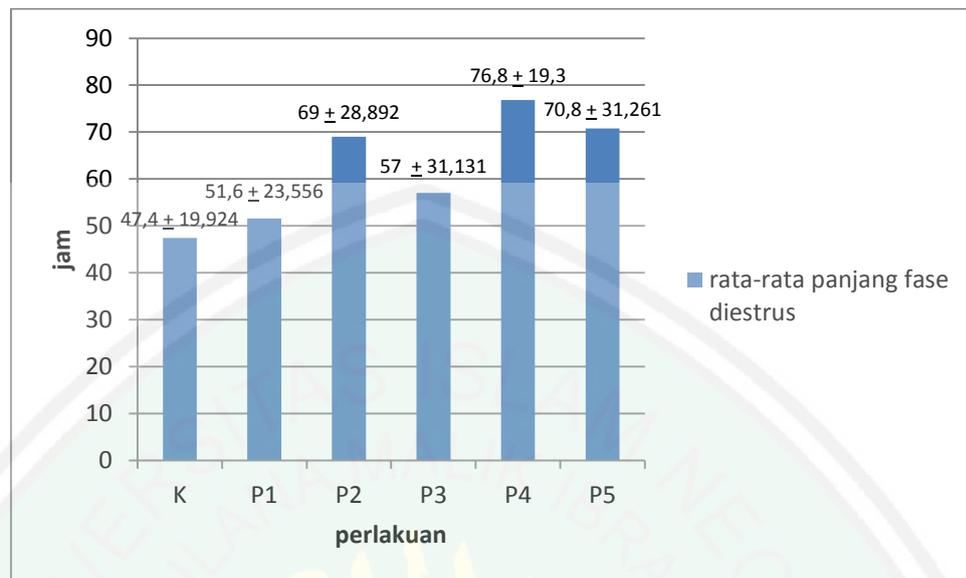
Setiap fase dalam siklus estrus memiliki panjang fase yang berbeda-beda. Pada tikus, fase proestrus berlangsung selama  $\pm 12$  jam, fase estrus  $\pm 12$  jam, metestrus  $\pm 21$  jam sedangkan diestrus selama  $\pm 60-70$  jam (Turner & Bagnara, 1998). Diestrus merupakan fase terpanjang, seringkali dijadikan salah satu cara untuk mengukur tingkat kesuburan pada mamalia. Oleh sebab itu, perlu diketahui terlebih dahulu kenampakan setiap fase, guna mengetahui ciri-ciri fase diestrus dengan metode ulas vagina. Sediaan ulasan yang telah diwarnai Giemsa diamati menggunakan mikroskop komputer binokuler CX Olympus CX31. Hasil data ulasan setiap fase siklus estrus yang diperoleh setelah pemberian perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas berupa fase estrus, proestrus, diestrus dan metestrus dapat dilihat pada gambar 4.1 berikut.



**Gambar 4.1:** Hasil pemeriksaan setiap fase pada siklus estrus. Keterangan: 1 = Leukosit, 2 = sel epitel kornifikasi dan 3 = sel epitel berinti. Fase pada siklus estrus terdiri atas (A) proestrus, (B) Estrus, (C) Metestrus dan (D) Diestrus.

Gambar 4.1 menunjukkan ciri-ciri yang terdapat pada setiap fase siklus estrus yang diperoleh dari ulasan vagina. Gambar A merupakan fase proestrus yang ditandai dengan munculnya sel epitel berinti dan sel kornifikasi. Gambar B adalah fase estrus yang ditunjukkan dengan adanya dominansi sel epitel kornifikasi. Gambar C adalah fase metestrus yang ditandai dengan munculnya tiga jenis sel yang berbeda, yakni sel epitel berinti, sel epitel kornifikasi dan adanya sel leukosit. Gambar D adalah Fase diestrus ditandai dengan adanya dominansi sel leukosit.

Pengukuran panjang fase diestrus dengan ulasan vagina dilakukan selama pemberian perlakuan berupa kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas. Hasil data pengamatan dapat dilihat pada gambar diagram 4.2 berikut:



**Gambar 4.2.** Rata-rata panjang fase diestrus tikus betina selama 15 hari perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas. Keterangan: K = Kontrol, P1 = dosis 25 mg/kg bb, P2 = 50 mg/kg bb, P3 = 75 mg/kg bb, P4 = 125 mg/kg bb, P5 = 200 mg/kg bb.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata, tikus yang mendapatkan perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas mengalami fase diestrus lebih panjang dibandingkan dengan tikus kontrol. Tikus kontrol mengalami rata-rata panjang fase diestrus selama  $\pm 47,4$  jam. Tikus kelompok perlakuan P1 yang diberi dosis 25mg/kg bb rata-rata mengalami fase diestrus selama  $\pm 51,6$  jam. Fase diestrus pada kelompok perlakuan P2 mengalami pemanjangan rata-rata hingga  $\pm 69$  jam tiap siklus. Namun pada P3 (75mg/kg bb) rata-rata diestrus berlangsung selama  $\pm 57$  jam. Pemanjangan fase diestrus paling lama nampak pada P4 (dosis 125mg/kg bb) dengan rata-rata panjang diestrus yakni  $\pm 76,8$  jam. Sedangkan pada perlakuan P5 sekaligus dosis tertinggi yakni 200mg/kg bb justru mengalami penurunan panjang diestrus hingga  $\pm 70,8$  jam. Turner & Bagnara (1998) dan Hafez (1970) menjelaskan bahwa fase diestrus pada tikus normal berlangsung

$\pm 60-70$  jam, maka panjang fase diestrus pada tiap kelompok perlakuan masih dalam kategori normal.

Data rata-rata panjang diestrus yang diperoleh selama 15 hari perlakuan, selanjutnya untuk menguji uji normalitas data dilakukan uji Lavene dan homogenitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Hasilnya, data rata-rata panjang diestrus normal dan homogen sebagaimana disajikan pada lampiran 1. Selanjutnya analisa dilakukan dengan menggunakan anova univariate tunggal (one way anova) tentang pengaruh kombinasi ekstrak pegagan dan beluntas terhadap panjang fase diestrus tikus betina dengan taraf signifikansi 5%.

Tabel 4.1 Ringkasan one way anova tentang pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap diestrus pada tikus betina.

s.k.	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
perlakuan	5	2766,96	553,392	0,808769	3,29	4,56
Galat	18	12316,32	684,24			
Total	23	15083,28				

Keterangan: Nilai signifikansi F hitung < F tabel

Berdasarkan tabel 4.1 tersebut diatas dapat diketahui bahwa F hitung < F tabel 5%, sehingga  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak. Meskipun pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas memberikan perbedaan rata-rata panjang fase diestrus antar kelompok perlakuan, namun uji secara statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan. Dengan begitu, maka tidak dapat dilakukan uji lanjut terhadap data tersebut. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada hasil analisa menggunakan SPSS 16 sebagaimana disajikan pada lampiran 2.

Fase diestrus ditandai dengan ditemukannya dominansi sel leukosit pada diestrus awal dan mulai nampak muncul sel epitel berinti dalam jumlah yang sedikit pada fase diestrus akhir, atau mendekati fase proestrus. Pada tikus normal

diperoleh data selama 2-3 hari tikus dalam keadaan diestrus. Fase diestrus pada tikus betina dapat berlangsung selama kurang lebih 60-70 jam (Turner dan Bagnara, 1998).

Secara garis besar, pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas menyebabkan pemanjangan diestrus namun hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa data tidak berbeda secara signifikan. Meskipun terjadi penurunan panjang diestrus terutama pada kelompok perlakuan P3 (75mg/kg bb), namun penurunan tidak sampai mendekati tikus kontrol, bahkan cenderung lebih tinggi dibanding perlakuan P1 (25mg/kg bb). Pada kelompok perlakuan P4 (125mg/kg bb), tikus mengalami fase diestrus yang paling panjang dibanding perlakuan lainnya, namun masih pada taraf mendekati normal (60-70 jam), begitupula dengan kelompok perlakuan P5 (200mg/kg bb) yang memiliki pemanjangan masih berkisar 70,8 jam.

Meskipun pada dosis tinggi tidak memberikan efek toksisitas sebagaimana Mustikasari (2015) yang membuktikan bahwa kombinasi ekstrak pegagan dan beluntas tidak mempengaruhi hepar namun pada dosis 200mg/kg bb dapat menyebabkan kerusakan hepar. Namun pada dosis 200mg/kg bb ini tidak membuat fase diestrus menjadi lebih panjang bila dibandingkan dengan perlakuan dosis 125mg/kg bb. Pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas dapat digunakan sebagai bahan antifertil alami yang cukup aman. Karena meskipun beluntas diberikan dengan dosis tinggi dan menunjukkan sedikit kerusakan pada hepar, namun tidak mengganggu siklus estrus. Berbeda halnya dengan efek samping berupa gangguan siklus estrus (menstruasi) yang tering

terjadi sebagai efek samping konsumsi obat kontrasepsi hormonal berbahan kimia. Tentunya dengan penelitian lanjut yang lebih detail mengenai efeknya terhadap kadar hormon-hormon maupun jaringan tubuh yang lain.

Pengamatan terhadap panjang fase diestrus menunjukkan bahwa rata-rata kelompok perlakuan mengalami pemanjangan fase diestrus. Hal tersebut dipengaruhi oleh kadar estrogen dalam tubuh sehingga membuat sel epitel vagina mengelupas ke lumen vagina, pada hasil ulas vagina menunjukkan hanya terdapat sel leukosit. Pada fase diestrus, kadar hormon estrogen menurun sehingga terjadi pelepasan epitel dan penyusunan leukosit (Partodihardjo, 1992). Defisiensi hormon menyebabkan sel epitel menjadi tipis tanpa disertai sel-sel kornifikasi. Mukosa vagina yang tipis pada fase diestrus menyebabkan leukosit dapat bermigrasi ke lumen vagina. Leukosit yang nampak pada ulasan vagina adalah sel-sel parabasal dari epitel vagina yang terkelupas ke lumen vagina (Junquera dan Carnero, 1982).

Hasil ulasan vagina nampak berbagai jenis sel yakni sel epitel berinti, sel leukosit dan sel kornifikasi. Pada fase proestrus, ditandai dengan adanya dominansi sel epitel berinti dan sedikit sel kornifikasi. Fase estrus ditunjukkan dengan dominansi epitel kornifikasi, pada fase metestrus terdapat tiga jenis sel sekaligus yakni sel epitel berinti, sel kornifikasi dan sel leukosit. Junquera dan Carnero (1982) menyebutkan bahwa sel epitel berinti berasal dari sel-sel intermediet, sel epitel kornifikasi berasal dari sel superfisial, dan leukosit berasal dari sel parabasal, ketiga jenis sel tersebut merupakan sel yang menyusun epitel vagina dan proliferasinya dipengaruhi oleh kadar hormon estrogen dalam tubuh.

Pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas mempengaruhi siklus estrus hewan perlakuan diantaranya melalui fitoestrogen yang dikandung. Baik daun pegagan maupun beluntas memiliki kandungan triterpenoid saponin, salah satu jenisnya adalah genistein yang sering disebut genin. Genin melalui serangkaian proses kimiawi dibentuk menjadi estradiol dan progesteron (Andria, 2012). Panjang setiap fase dalam siklus estrus dipengaruhi oleh hormon, termasuk estrogen.

Triterpenoid saponin mengandung steroid yaitu diosgenin atau yang sering disebut dengan genin. Genin dapat diubah menjadi progesteron melalui proses kimia yang menghasilkan testosteron dan estradiol. Progesteron dibentuk dari pregnenolon melalui penghilangan atom hydrogen dari C3 dan pergeseran ikatan ganda dari cincin B pada posisi 5-6 ke cincin A pada posisi 4-5, perubahan ini oleh adanya bantuan enzyme  $3\beta$  hidroksi dehidrogenase dan  $\Delta^{4-5}$  isomerase, selanjutnya dengan bantuan enzyme  $17\alpha$  hidroksilase, progesteron akan diubah menjadi 17 hidroksi progesteron yang kemudian mengalami demolase menjadi bentuk testoteron, yang selanjutnya testosteron mengalami aromatisasi (pembentukan gugus hidroksi fenolik pada atom C3) menjadi estradiol (E2) (Andria 2012).

Senyawa estradiol akan berikatan dengan reseptor estrogen (ER  $\alpha$ ) yang terdapat di membran nukleus, sehingga mengaktifasi elemen respon estrogen dibagian dalam membran nukleus (Khoiriyah, Susilowati, and Syarifah 2014). Fitoestrogen menembus sel dan masuk ke dalam sitoplasma, kemudian berikatan dengan reseptor estrogen di sitoplasma membentuk ikatan hormon-reseptor pada

*Estrogen Responsive Element* (ERE), kemudian bergerak menuju inti sel untuk berikatan dengan DNA. Selanjutnya terjadi transkripsi sel untuk membentuk protein-protein khusus yang diperlukan dalam mitosis sel. Ketika proses transkripsi sintesis protein, terbentuk kompleks fitoestrogen-reseptor estrogen yang tidak hanya berikatan dengan ERE namun juga berikatan dengan *co-regulator*. Co-regulator terdiri dari co-activator yang berfungsi untuk menginduksi terjadinya proses transkripsi gen dari ikatan kompleks fitoestrogen-reseptor estrogen, sehingga dapat diproduksi suatu *messenger-RNA* (mRNA) yang mengakibatkan terjadinya sintesis protein sesuai dengan karakteristik hormon. Sedangkan co-reseptor akan bekerja sebaliknya yakni menghambat proses transkripsi gen. Hal ini akan mempengaruhi transkripsi dan translasi serta proses maturasi folikulogenesis dari folikel preantral menjadi folikel antral, sehingga memicu proses ovulasi folikel dan terbentuknya korpus luteum yang menghasilkan estrogen (Gruber et al. 2002; Khoiriyah, Susilowati, and Syarifah 2014).

Kadar estrogen yang tinggi akan menghambat (inhibisi) hipofisis anterior dengan umpan balik negatif, sehingga hormon FSH dan LH tidak dikeluarkan oleh hipofisis anterior, maka hal ini akan mengganggu proses perkembangan sel folikel ovarium, sehingga kadar estradiol menjadi menurun dan ovulasi tidak terjadi, maka tidak terbentuklah korpus luteum yang berfungsi untuk mensekresikan hormon progesteron (Andria 2012). Akibatnya terjadi perubahan panjang fase diestrus.

Perubahan panjang siklus estrus dipengaruhi beberapa hal yang dapat menyebabkan perubahan hormonal, antara lain berupa pemberian asupan kaya nutrisi ataupun faktor lain semisal stres. Stres dapat mempengaruhi berbagai aspek fisiologi, termasuk sistem imun, kardiovaskuler, saraf maupun sistem reproduksi (Mustikasari, 2015).

Stress dapat mempengaruhi siklus estrus, melalui perubahan produksi progesteron selama siklus estrus. Stress menyebabkan produksi progesteron naik, dan menghambat pelepasan LH dan FSH (Lovick, 2012). Sehingga kadar estrogen akan terganggu, dan mengganggu tiap fase pada siklus estrus. Pada hewan pengerat, hal ini dapat berlangsung meski dengan pengaruh stress yang singkat. Pengaruh terutama nampak pada fase anestrus atau diestrus, ditunjukkan dengan pemanjangan yang tidak teratur (Lovick 2012). Stres dapat dipengaruhi faktor lingkungan seperti kondisi kandang, maupun stres yang berasal dari tubuh semisal imunitas. Hal inilah yang menjadi penyebab pemanjangan siklus estrus terkait efek pemberian perlakuan. Namun pada pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas, pemanjangan fase diestrus tidak terjadi secara signifikan.

## 4.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap Proliferasi Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina

Pengamatan terhadap proliferasi epitel vagina tikus dilakukan dengan mengamati indeks maturasi epitel vagina dan ketebalan epitel vagina.

### 4.2.1 Indeks Maturasi Epitel Vagina

Tabel 4.2 Hasil rata-rata indeks maturasi sel vagina yang dipengaruhi perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas

Perlakuan	Rata-rata IM epitel vagina
K	25,88
P1	55,86
P2	60,34
P3	65,25
P4	21,31
P5	33,42

Keterangan: K = kontrol, P1 =dosis 25 mg/kg bb, P2 = dosis 50mg/kg bb, P3 = dosis 75mg/kg bb, P4 = dosis 125mg/kg bb, P5 = dosis 200mg/kg bb.

Berdasarkan tabel 4.2 tersebut, nampak bahwa rata-rata pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas memberikan hasil yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Tikus kontrol (K) hanya diberi larutan NaCMC 0,5%, sedangkan perlakuan 1 (P1) adalah tikus yang diberi dosis 25mg/kg bb. Perlakuan 2 (P2) adalah tikus perlakuan dengan dosis 50mg/kg bb. Perlakuan 3 (P3) yakni dosis perlakuan sebesar 75mg/kg bb. Dosis tinggi diterapkan pada perlakuan 4 (P4) yakni sebesar 125mg/kg bb dan dosis tertinggi adalah 200mg/kg bb pada kelompok perlakuan P5.

Data rata-rata indeks maturasi epitel vagina tersebut selanjutnyadialalisa homogenitasnyamenggunakan tes kolmogorov-smirnov dan uji lavene untuk menguji normalitas data. Hasilnya, data terdistribusi secara homogen dan normal

dengan nilai  $p > 0,05$ . Sebagaimana dapat dilihat pada lampiran 5. Selanjutnya dilakukan uji anova tunggal untuk memastikan pengaruh yang dihasilkan terhadap proliferasi epitel vagina.

Tabel 4.3: Ringkasan analisa statistik *one way anova* tentang pengaruh pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap indeks maturasi epitel vagina

S.K.	d.b.	Jk	Kt	F Hitung	F Tabel
Perlakuan	5	7254,695	1450,939	17,685	2,77
Galat	18	1476,753	82,042		
Total	23	8731,448			

Keterangan: Indeks maturasi vagina. sig. F hitung > F tabel artinya terdapat perbedaan nyata antara perlakuan dengan kontrol

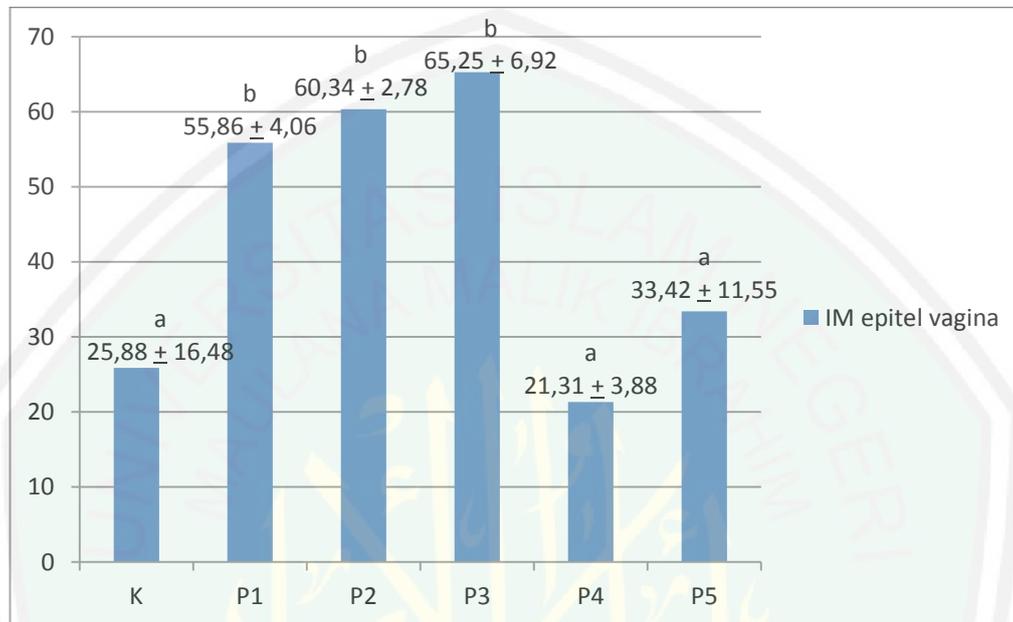
Data hasil analisa anova tunggal pada tabel 4.3 menunjukkan bahwa F hitung > F tabel 5% pada perhitungan indeks maturasi sel epitel vagina. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas memberikan pengaruh terhadap proliferasi epitel vagina yang ditunjukkan dengan indeks maturasi. Untuk mengetahui dosis perlakuan yang lebih efektif untuk proliferasi epitel vagina, dilakukan uji lanjut menggunakan BNT (Beda Nyata Terkecil) 5%. Berdasarkan hasil uji BNT 5% dari rata-rata indeks maturasi epitel vagina, maka diperoleh hasil notasi sebagaimana disajikan pada tabel berikut:

Tabel 4.4: Ringkasan BNT 5% tentang pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap proliferasi epitel vagina.

Perlakuan	Indeks maturasi epitel vagina	Keterangan
K	$25,88 \pm 16,48^a$	Efek estrogen rendah
P1	$55,86 \pm 4,06^b$	Efek estrogen sedang
P2	$60,34 \pm 2,78^b$	Efek estrogen sedang
P3	$65,25 \pm 6,92^b$	Efek estrogen tinggi
P4	$21,31 \pm 3,88^a$	Efek estrogen rendah
P5	$33,42 \pm 11,55^a$	Efek estrogen rendah

Keterangan: Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antara perlakuan dan kontrol ( $p < 0,05$ ).

Untuk memudahkan pembacaan disajikan dalam gambar grafik sebagaimana berikut:



Gambar 4.3 Hasil uji lanjut BNT 5% dan notasi indeks maturasi epitel vagina pada berbagai perlakuan pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas selama 15 hari perlakuan.

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa nilai indeks maturasi vagina pada tikus kontrol (K)  $\pm 25,88$ , yakni pada fase diestrus kadar efek estrogen sedang rendah. Pemberian perlakuan pada kelompok P1 dengan dosis 25mg/kg bb cukup meningkatkan efek estrogen menjadi taraf sedang, perbedaan dengan kontrol ditunjukkan pula dengan notasi hitung yang berbeda. Kelompok perlakuan P2 (dosis 25mg/kg bb) tidak memiliki notasi hitung yang berbeda dengan P1, begitupula efek estrogen pada epitel vagina juga tergolong rendah dengan nilai rata-rata  $\pm 60,34$ . Estrogen memberikan efek cukup tinggi pada kelompok perlakuan P3 (dosis 75mg/kg bb) dengan nilai indeks maturasi  $\pm 65,25$ , meskipun

begitu notasi yang dihasilkan tidak berbeda dengan P2, artinya pada kedua perlakuan tersebut terdapat perbedaan yang nyata.

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa nilai indeks maturasi vagina pada tikus kontrol (K)  $\pm 25,88$ , yakni pada fase diestrus kadar efek estrogen sedang rendah. Pemberian perlakuan pada kelompok P1 dengan dosis 25mg/kg bb cukup meningkatkan efek estrogen menjadi taraf sedang, perbedaan dengan kontrol ditunjukkan pula dengan notasi hitung yang berbeda. Kelompok perlakuan P2 (dosis 25mg/kg bb) tidak memiliki notasi hitung yang berbeda dengan P1, begitupula efek estrogen pada epitel vagina juga tergolong rendah dengan nilai rata-rata  $\pm 60,34$ . Estrogen memberikan efek cukup tinggi pada kelompok perlakuan P3 (dosis 75mg/kg bb) dengan nilai indeks maturasi  $\pm 65,25$ , meskipun begitu notasi yang dihasilkan tidak berbeda dengan P2, artinya pada kedua perlakuan tersebut terdapat perbedaan yang nyata.

Penurunan efek estrogen ditunjukkan oleh kelompok perlakuan selanjutnya yakni pada P3 (dosis 125mg/kg bb), terjadi penurunan nilai indeks maturasi epitel vagina menjadi  $\pm 21,31$ . Nilai Indeks maturasi yang ditunjukkan berada dibawah kontrol, begitupun notasi hitung yang tidak berbeda dengan kontrol dan P1 artinya tidak terdapat perbedaan dengan kontrol. Hal ini sebanding dengan hasil penelitian Mucharomah, dkk (2017) yang menunjukkan bahwa pada dosis 125mg/kg bb kadar estrogen mengalami penurunan akibat adanya *feedback* negatif dari kombinasi ekstrak pegagan dan beluntas pada dosis tersebut. Kelompok perlakuan P5 memiliki nilai indeks maturasi yang mengalami peningkatan menjadi  $\pm 33,42$ , meskipun begitu efek estrogen yang dihasilkan

masih dalam kadar yang rendah, sehingga tidak memberikan pengaruh yang cukup berarti. Dosis optimal untuk memberikan efek estrogen terhadap proliferasi epitel vagina yang ditunjukkan dengan nilai indeks maturasi tertinggi adalah pada kelompok perlakuan P3 dengan dosis 75mg/kg bb.

Tabel 4.5 Distribusi sel epitel vagina yang dipengaruhi kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas

Perlakuan	Rata-rata sel		
	Parabasal (%)	Intermediet (%)	Superfisial (%)
K	66,31	18,02	15,67
P1	20,39	48,87	30,74
P2	18,1	43,49	38,41
P3	5,69	57,97	36,33
P4	66,68	24,44	8,88
P5	45,63	41,91	12,46

Dapat dilihat pada tabel 4.5 bahwa pada kontrol (K) sel parabasal persentasenya lebih tinggi dibandingkan sel intermediet dan superfisial, hal ini menunjukkan bahwa proses diferensiasi sel berlangsung secara lambat. Persentase sel superfisial mengalami peningkatan pada kelompok P1 (dosis 25mg/kg bb) sebanyak 30,74%. Persentase sel superfisial tertinggi dicapai oleh kelompok perlakuan P2 (dosis 50mg/kg bb) mencapai 38,41%. Sedangkan pada kelompok perlakuan P3 (dosis 75mg/kg bb) mulai mengalami penurunan menjadi 36,33%.

Persentase sel superfisial yang tinggi cukup tinggi menunjukkan bahwa diferensiasi sel epitel vagina pada perlakuan P1, P2 dan P3 berjalan dengan baik. Penurunan persentase sel superfisial secara signifikan justru terjadi pada dosis perlakuan yang lebih tinggi yakni pada kelompok perlakuan P4 (125mg/kg bb) mencapai 8,88%, dengan sel parabasal mencapai 66,68% dan sel intermediet sebesar 24,44%. Tidak berbeda jauh dengan kelompok perlakuan P4, kelompok

P5 mengalami peningkatan persentase sel superfisial yang masih cukup rendah jika dibanding P1, P2, dan P3 yakni hanya 12,46% dan sel parabasal sebesar 45,63%. Hal ini menunjukkan bahwa proses diferensiasi sel epitel pada kelompok perlakuan P4 dan P5 berlangsung dalam kadar yang rendah. Hasil ini sebanding dengan nilai indeks maturasi terkait efek estrogen rendah yang dihasilkan pada P4 dan P5. Persentase sel superfisial yang tinggi menunjukkan besarnya efek estrogen, sedangkan sel parabasal yang tinggi menunjukkan rendahnya efek estrogen dalam tubuh. Defisiensi estrogen akan mengakibatkan penurunan proliferasi epitel serta maturasi epitel menjadi sel intemediet dan sel superfisial. Hal ini terjadi karena semua lapisan hilang kecuali lapisan sel basal (Amran, 2010).

Beluntas memiliki senyawa aktif berupa flavonoid, alkaloid, triterpen, tanin (Susetyarini, 2009), monoterpen atau sesquiterpen, sterol, fenol, dan hidrokuinon (Widyawati dkk, 2012). Sedangkan pegagan memiliki bahan aktif utama terpenoid khususnya triterpenoid yang terdiri atas asiatikosida, sentelosida, madekasosida, brahmosida dan brahminosida (glikosida saponin), asam asiaticentoic, asam centellic, asam centoic dan asam madekasat (Barnes, 2002). Triterpenoid saponin mengandung steroid yaitu diosgenin atau yang sering disebut dengan genin. Genin digunakan sebagai bahan baku untuk sintesis hormon steroid. Genin dapat diubah menjadi progesteron melalui serangkaian proses kimia yang menghasilkan testosteron dan estradiol (Andria, 2012).

Diduga saponin, alkaloid dan triterpenoid ikut masuk dalam jalur biosintesa steroid terutama hormon estrogen sehingga akan dihasilkan bahan yang

strukturnya mirip dengan hormon tersebut. Selanjutnya bahan ini disekresi bersama hormon tersebut ke sel target. Pada sel target bahan tersebut akan masuk ke sel bersama hormon, selanjutnya akan menempati reseptor hormon akibatnya aksi hormon pada sel target akan berkurang. Beluntas maupun pegagan memiliki senyawa triterpenoid yang dapat dirubah menjadi sitosterol berupa estradiol (Nurliani 2007).

Estradiol memiliki pengaruh terhadap proliferasi epitel vagina. Estradiol yang terbentuk akan bereaksi dengan reseptor pada sel vagina. Efek biologis estrogen diperantarai oleh reseptor estrogen. Reseptor estrogen merupakan faktor transkripsi yang memediasi efek pleiotropik hormon steroid terhadap pertumbuhan, perkembangan dan pemeliharaan bermacam-macam jaringan. Estrogen mempengaruhi proliferasi, differensiasi dan keratinisasi epitel melalui pengaturan produksi beberapa protein yang terlibat dalam proliferasi sel dan pengaturan siklus sel (Arina, 2008).

Pegagan dan beluntas memiliki senyawa fitosteroid berupa stigmasterol, sitosterol, dan kampesterol, dapat digunakan sebagai prekursor hormon seks steroid, salah satunya adalah estrogen. Hal tersebut disebabkan kemiripan struktur ketiga senyawa fitosteroid dengan kolesterol. Efek estrogenik ekstrak pegagan dan beluntas terhadap epitel vagina dapat dilihat pada aktivitas mitogenik sel-sel organ reproduksi pada epitel uterus, vagina, dan mammae. Aktivitas mitogenik tersebut berupa proliferasi maupun diferensiasi sel-sel epitel. Aktivitas mitogenik sel epitel dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Estrogen dapat berikatan langsung dengan RE  $\alpha$  epitel ataupun secara tidak langsung dengan RE  $\alpha$  stroma.

Proliferasi yang terjadi pada sel-sel epitel endometrium uterus, epitel vagina, dan epitel duktus mammae terjadi secara tidak langsung yang dibantu oleh faktor parakrin yang dihasilkan sel stroma akibat induksi estrogen (Kusmana et al. 2007).

Pemberian fitoestrogen dapat meningkatkan tebal pita-pita protein reseptor estrogen (ER)  $\alpha$  (Kusmana et al. 2007). Ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  lebih banyak dibandingkan reseptor estrogen  $\beta$  pada vagina. Reseptor estrogen  $\alpha$  dibutuhkan untuk proliferasi, stratifikasi dan kornifikasi sel epitel vagina yang diinduksi oleh estrogen dan reseptor estrogen  $\beta$  saja tidak cukup untuk memediasi efek estrogen ini tanpa adanya reseptor estrogen  $\alpha$  (David L. Buchanan et al. 1998). Karena eksistensi reseptor  $\alpha$  inilah sel epitel vagina dapat berproliferasi sebagai respon terhadap fitoestrogen (David L. Buchanan et al. 1998) dari beluntas dan pegagan. Tentunya dengan dosis yang tepat, sehingga dapat diperoleh efek estrogen secara optimal. Hasil menunjukkan bahwa pada vagina, dosis 75mg/kg bb dapat memberikan efek paling tinggi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Muchtaromah, dkk (2017) yang membuktikan kadar estrogen paling tinggi diperoleh pada dosis 75mg/kg bb kombinasi ekstrak pegagan dan beluntas.

#### 4.2.2 Tebal Epitel Vagina

Proliferasi epitel vagina dapat diketahui berdasarkan nilai indeks maturasi epitel dan tingkat ketebalan epitel vagina. Berikut ini disajikan tabel hasil rata-rata pengukuran ketebalan vagina.

Tabel 4.6 Data hasil rata-rata tebal epitel vagina yang dipengaruhi perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas

Perlakuan	Rata-rata tebal epitel vagina ( $\mu\text{m}$ )
K	0,35
P1	0,41
P2	0,37
P3	0,53
P4	0,37
P5	0,63

Keterangan: K = kontrol, P1 = dosis 25mg/kg bb, P2 = dosis 50mg/kg bb, P3 = dosis 75mg/kg bb, P4 = dosis 125 mg/kg bb, P5 = dosis 200mg/kg bb.

Data rata-rata tebal epitel vagina yang diperoleh pada tabel 4.6 tersebut selanjutnyadialisa homogenitasnyamenggunakan tes kolmogorov-smirnov dan uji lavene untuk menguji normalitas data, hasilnya data terdistribusi secara homogen dan normal dengan nilai  $p > 0,05$ . Sebagaimana dapat dilihat pada lampiran 6. Selanjutnya dilakukan uji anova tunggal untuk memastikan pengaruh yang dihasilkan terhadap proliferasi epitel vagina.

Tabel 4.7 Analisa statistik anova tunggal pengaruh pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap tebal epitel vagina

S.K	d.b.	Jk	Kt	F hitung	F tabel
Perlakuan	5	0,256271	0,051254	3,309983	2,77
Galat	18	0,278725	0,015485		
Total	23	0,534996			

Keterangan: signifikansi F hitung  $>$  F tabel artinya terdapat perbedaan nyata antara perlakuan dengan kontrol

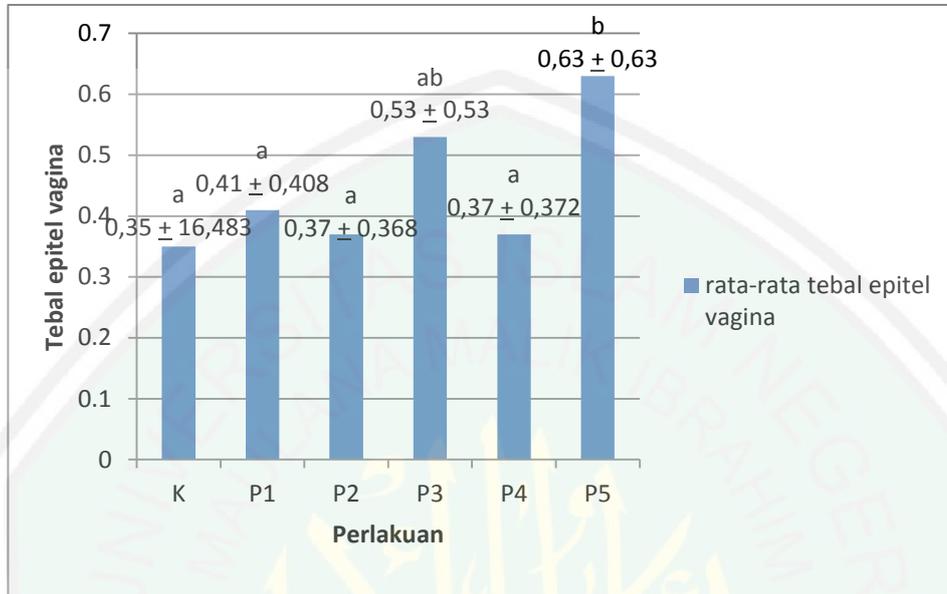
Data hasil analisa anova tunggal pada tabel 4.3 menunjukkan bahwa  $F_{hitung} > F_{tabel}$  dengan  $\alpha 5\%$  baik pada perhitungan tebal epitel vagina. Maka diartikan bahwa pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas memberikan pengaruh terhadap proliferasi epitel vagina yang ditunjukkan dengan ketebalan vagina. Untuk mengetahui dosis perlakuan yang lebih efektif untuk proliferasi epitel vagina, dilakukan uji lanjut menggunakan Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%. Berdasarkan hasil uji BNT 5% dari rata-rata tebal epitel vagina, maka diperoleh hasil notasi sebagaimana berikut:

Tabel 4.8 Ringkasan BNT 5% tentang pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap proliferasi epitel vagina.

Perlakuan	Ketebalan vagina ( $\mu\text{m}$ )
K	$0,344 \pm 16,483^a$
P2	$0,3675 \pm 0,368^a$
P4	$0,3725 \pm 0,372^a$
P1	$0,4075 \pm 0,408^a$
P3	$0,53 \pm 0,53^{ab}$
P5	$0,63 \pm 0,63^b$

Keterangan: K = kontrol, P1= dosis 25mg/kg bb, P2= dosis 50mg/kg bb, P3= dosis 75mg/kg bb, P4= dosis 125mg/kg bb, P5= dosis 200mg/kg bb. Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antara perlakuan dan kontrol ( $p < 0,05$ ).

Dari data pada tabel 4.7 tersebut untuk lebih memudahkan pembacaan, disajikan berupa gambar sebagaimana berikut:

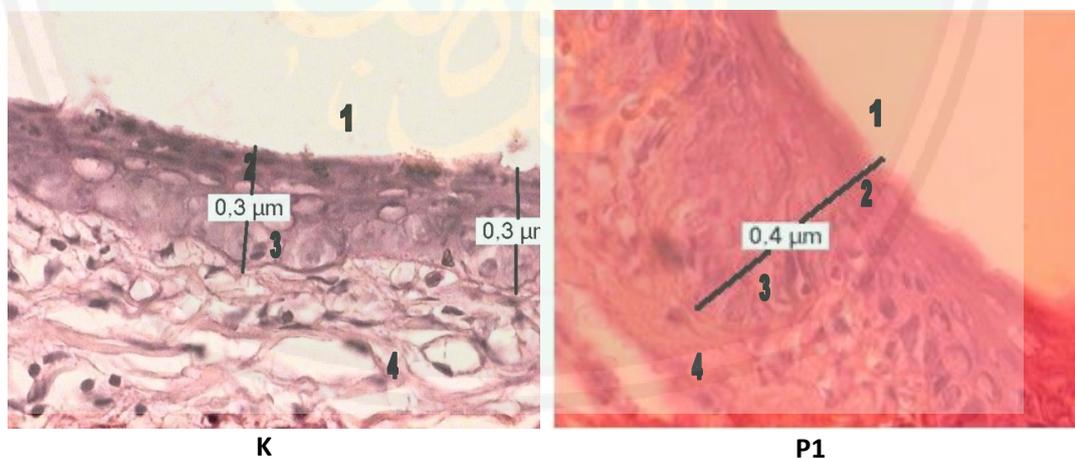


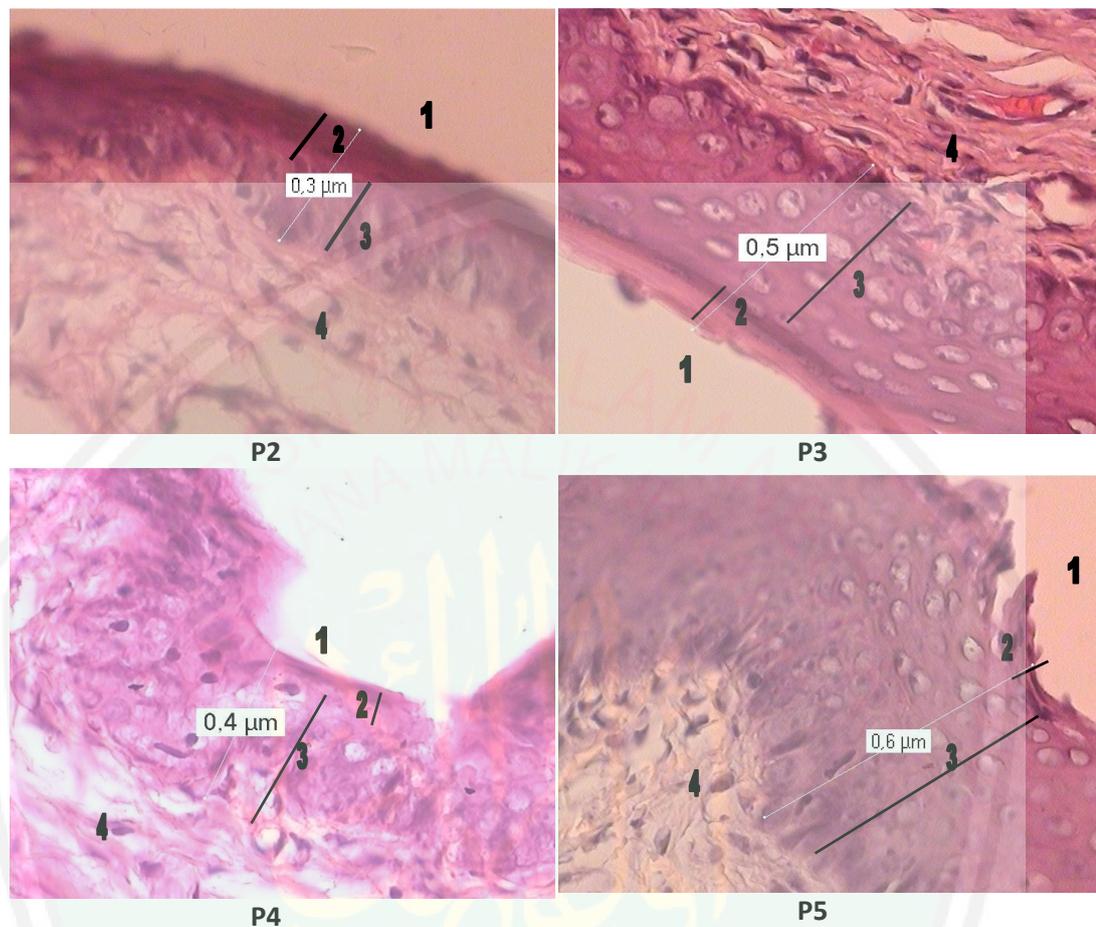
Gambar 4.4 Hasil uji lanjut dan notasi BNT 5% tebal epitel vagina dalam satuan mikrometer pada berbagai dosis perlakuan pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas selama 15 hari perlakuan.

Berdasarkan tabel notasi tersebut, maka dapat dilihat bahwa ada perbedaan yang nyata antar perlakuan. Pemberian kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas dapat mempengaruhi ketebalan epitel vagina. Tabel 4.8 dan gambar 4.3 menunjukkan bahwa terdapat notasi hitung yang sama antara kontrol (K), kelompok P1 ( dosis 25mg/kg bb) dan P2 (dosis 50mg/kg bb) artinya pada taraf perbandingan 5% tidak terdapat perbedaan yang nyata. Pada kelompok perlakuan P3 (dosis 75mg/kg bb) memiliki nilai rata-rata tebal epitel yang lebih tinggi dibandingkan P1 dan P2, begitupula notasi hitung yang berbeda. Nampak bahwa peningkatan ketebalan vagina sebanding dengan peningkatan kadar dosis perlakuan. Namun pada kelompok perlakuan p4 (dosis 125mg/kg bb) ketebalan epitel vagina justru mengalami penurunan hingga notasi hitung yang diperoleh

sama dengan kontrol, P1 dan P2. Kelompok perlakuan P5 (dosis 200mg/kg bb) menunjukkan rata-rata ketebalan epitel vagina cukup tinggi begitupula dengan notasi hitung yang berbeda dibanding perlakuan sebelumnya. Hasil notasi tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata dibandingkan K, P1, P2, P3, dan P4. Ketebalan epitel vagina meningkat sejalan dengan optimalnya dosis yang diberikan.

Nilai hasil tebal epitel vagina dan indeks maturasi diperoleh dari gambaran histologi dari epitel vagina tikus perlakuan. Berikut ini hasil pengamatan gambaran histologi epitel vagina tikus yang diberi perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan daun beluntas dengan pewarnaan HE dan diamati menggunakan komputer binokuler CX Olympus CX31, sehingga dapat diketahui bagian-bagian jaringan epitel vagina.





Gambar 4.5 Histologi vagina tikus perlakuan. Keterangan: 1. Lumen vagina, 2. Epitel vagina yang mengalami kornifikasi, 3. Epitel berlapis pipih, 4. Lapisan muskularis. Perbesaran 400x (Purnamasari, dkk., 2012 dalam Khoiriyah, 2014). P1 = dosis 25mg/kg bb, P2 = dosis 50mg/kg bb, P3 = dosis 75mg/kg bb, P4 = dosis 125mg/kg bb, P5 = dosis 200mg/kg bb.

Gambar histologi tersebut menunjukkan perbedaan tebal epitel vagina tiap perlakuan. Kontrol yang tidak diberi perlakuan kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas memiliki tebal epitel yang cukup rendah dibanding P1, P2 dan P3. Tidak jauh berbeda, begitupula pada kelompok perlakuan yang lain tebal epitel vagina yang dibuktikan dengan gambaran histologi menunjukkan hasil yang sama.

Ketebalan lapisan epitel vagina kemungkinan dipengaruhi oleh adanya diferensiasi sel-sel epitel vagina. Diferensiasi merupakan perubahan struktural

maupun fungsional sel menuju kematangan (maturity). Diferensiasi dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung melalui pengikatan estrogen pada masing-masing RE  $\alpha$  yang terdapat pada sel stroma dan sel epitel. Mekanisme diferensiasi sel-sel epitel lebih rumit, namun diketahui bahwa rangkaian peristiwa diferensiasi epitel vagina memerlukan proses proliferasi epitel terlebih dahulu. Diferensiasi sel dapat dilihat dari perubahan sitologi sel epitel vagina, yaitu sel-sel parabasal menjadi sel superfisial pada lapisan epitel vagina. Hal tersebut yang kemudian menyebabkan keratinisasi pada lapisan bagian atas epitel vagina (Kusmana et al. 2007).

Pemberian fitoestrogen dapat meningkatkan tebal pita-pita protein reseptor estrogen (ER)  $\alpha$  (Kusmana et al. 2007). Ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  lebih banyak dibandingkan reseptor estrogen  $\beta$  pada vagina. Reseptor estrogen  $\alpha$  dibutuhkan untuk proliferasi, stratifikasi dan kornifikasi sel epitel vagina yang diinduksi oleh estrogen dan reseptor estrogen  $\beta$  saja tidak cukup untuk memediasi efek estrogen ini tanpa adanya reseptor estrogen  $\alpha$  (David L. Buchanan et al., 1998). Karena eksistensi reseptor  $\alpha$  inilah sel epitel vagina dapat berproliferasi sebagai respon terhadap fitoestrogen (David L. Buchanan et al., 1998) dari beluntas dan pegagan. Tentunya dengan dosis yang tepat, sehingga dapat diperoleh efek estrogen secara optimal. Hasil menunjukkan bahwa pada vagina, dosis 75mg/kg bb dapat memberikan efek paling tinggi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Muchtaromah (2017) yang membuktikan kadar estrogen paling tinggi diperoleh pada dosis 75mg/kg bb kombinasi ekstrak pegagan dan beluntas.

Daun pegagan dan beluntas telah lama dimanfaatkan sebagai tanaman yang memiliki khasiat obat karena selain mudah diperoleh, harga yang ekonomis serta dianggap lebih aman dibanding obat berbahan kimia. Sebagaimana firman Allah dalam surat Al Ra'd ayat 4.

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُّتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِنْ أَعْنَابٍ وَزَرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنْوَانٌ وَغَيْرُ  
صِنْوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضْلٌ بَعْضُهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ  
لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

“Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir” (Q.S. Al Ra'd (13): 4)

Al-A'masy telah meriwayatkan dari Abu Saleh, dari Abu Hurairah r.a., dari Nabi Saw. sehubungan dengan makna firman-Nya: “*Kami melebihkan sebagian tanam-tanaman itu atas sebagian yang lain tentang rasanya*” (Ar-Ra'd: 4). Lalu Nabi Saw. bersabda bahwa ada yang pahit, ada yang hambar, ada yang manis, dan ada yang asam. Dengan kata lain, perbedaan pada buah-buahan dan tanam-tanaman ini adalah dalam hal bentuk, warna, rasa, bau, daun, perbungaan dan manfaatnya. Sebagian di antaranya ada yang bermanfaat sebagai bahan pangan, bangunan dan sebagiannya lagi sebagai obat. padahal semuanya menyandarkan kehidupannya dari satu sumber, yaitu air; tetapi kejadiannya berbeda-beda dengan perbedaan yang cukup banyak tak terhitung. Dalam kesemuanya itu terkandung tanda-tanda kekuasaan Allah bagi orang yang menggunakan pikirannya (Katsir,

2014). Hal ini merupakan dalil yang kuat dan ayat yang nyata tentang kekuasaan Allah SWT bagi manusia yang memiliki kalbu (bathin) yang dapat berfikir. Dengan demikian, ia pun mendapat petunjuk untuk mentaati dan mengimani Rabbnya (al-Qarni, 2008).

Termasuk penggunaannya di beberapa daerah di Indonesia seperti di Sumatra dan Nusa Tenggara beluntas dan pegagan sering digunakan sebagai bahan ramuan tradisional untuk kesuburan, kontrasepsi, mengatasi keputihan maupun menambah kejantanan. Namun, ukuran penggunaannya masih sebatas beberapa genggam atau secukupnya (Nugroho and Sa'roni 2012). Sehingga, penggunaan dalam dosis yang tepat tentu dibutuhkan untuk mendapatkan hasil yang optimal. Sebagaimana secara implisit telah diajarkan Allah dalam firman-Nya surat Al-A'raf (7) ayat 31:

يَا بَنِي آدَمَ خُذُوا زِينَتَكُمْ عِنْدَ كُلِّ مَسْجِدٍ وَكُلُوا وَاشْرَبُوا وَلَا تُسْرِفُوا إِنَّهُ لَا يُحِبُّ  
الْمُسْرِفِينَ

*“Hai anak Adam, pakailah pakaianmu yang indah di setiap (memasuki) mesjid, makan dan minumlah, dan janganlah berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berlebih-lebihan” (Al A'raf (7): 31)*

Sebagian ulama' salaf mengatakan bahwa Allah Ta'ala telah menyatukan seluruh pengobatan pada setengah ayat ini: *وَكُلُوا وَاشْرَبُوا وَلَا تُسْرِفُوا* (makan dan minumlah dan janganlah kamu berlebih-lebihan) (Katsir, 2004). Menurut Al Jazairi (2009) Allah ta'ala memerintahkan untuk makan dan minum dari apa yang Allah halalkan, namun tidak boleh berlebih-lebihan.

Berlebih dalam hal penggunaan, termasuk obat-obatan, dan caranya dengan berlaku adil dan sederhana, dengan dosis yang tepat. Perintah makan dan

minum tidak berlebih-lebihan yakni tidak melampaui batas, merupakan tuntunan yang harus disesuaikan dengan kondisi setiap orang. Karena kadar tertentu yang dinilai cukup untuk seseorang, atau dinilai melampaui batas belum cukup untuk orang lain (Shihab, 2002). Karena sesungguhnya segala sesuatu berjalan sesuai dengan kadar dan ukurannya. Sebagaimana firman Allah dalam surat al Qamar (54) ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (Q.S Al Qamar (54):49)

Sebagaimana dalam hal penelitian, dosis yang tepat untuk memperoleh efek fitoestrogen yang optimal dari ekstrak daun pegagan dan beluntas adalah pada dosis 75mg/kg bb.

Usaha untuk mencari obat adalah hal yang diwajibkan bagi setiap manusia demi memperoleh kesembuhan. Rasulullah berabda “*InnaLLaha 'azza wajalla lam yunzil daa'an illa anzalalahu syifaa-an 'alimahu man 'alimahu wa jahilahu idza-ashobaddawa-udda-a bari-a bi-idzniLLah*” artinya ”Sesungguhnya Allah azza wa jalla tidak menurunkan penyakit melainkan Dia juga menurunkan obatnya, yang akan diketahui siapa pun yang mengetahuinya dan tidak diketahui siapa pun yang tidak mengetahuinya. Jika suatu obat dapat menyembuhkan penyakit, maka orang yang sakit akan sembuh dengan seizin Allah”. Oleh sebab itu, karena segala penyakit dan obat adalah milik Allah maka dengan mencari dosis yang optimal akan semakin mendekatkan dengan kesembuhan yang diharapkan.

Biarpun begitu tidak dapat dipungkiri bahwa penelitian ini hanyalah wujud ikhtiyar untuk mendapatkan kehidupan yang lebih baik. Tak lepas dari takdir dan kekuasaan Allah SWT atas segala sesuatu. Sebagaimana firman-Nya dalam surat Al Maidah ayat 97.

عَالِمُ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ الْكَبِيرِ الْمُتَعَالِ

“Yang mengetahui semua yang gaib dan yang nampak, yang Maha besar lagi Maha tinggi”

Ayat tersebut menegaskan bahwa manusia sesungguhnya hanya bisa berusaha, namun hanya Allah yang berhak menentukan hasil atas apa yang diusahakannya. Seperti halnya dengan hasil penelitian ini, seiring dengan berkembangnya penelitian dan metode yang lebih detail di masa depan akan ditemukan hasil yang beragam atau justru berbeda dengan hasil saat ini. Sesungguhnya Allah mengetahui apa yang tidak kita ketahui dan mengetahui rahasia antara langit dan bumi, yang nampak maupun yang gaib.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian terhadap pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap panjang fase diestrus dan proliferasi epitel vagina tikus betina, maka dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Kombinasi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan daun beluntas (*Pluchea indica*) tidak memberikan pengaruh terhadap lama fase diestrus pada tikus betina
2. Kombinasi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan daun beluntas (*Pluchea indica*) mampu memberikan pengaruh terhadap kematangan sel epitel vagina tikus betina yang ditunjukkan dengan indeks maturasi epitel vagina. Nilai indeks maturasi paling tinggi ditunjukkan oleh kelompok perlakuan dosis 75mg/kg bb, yang menunjukkan bahwa dosis tersebut merupakan dosis optimal untuk memberikan efek estrogen tertinggi.
3. Kombinasi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan daun beluntas (*Pluchea indica*) memberikan pengaruh terhadap tebal epitel vagina, epitel vagina paling tebal pada dicapai oleh kelompok dosis perlakuan 75mg/kg bb.

## 5.2 Saran

Akan lebih baik apabila dilakukan penelitian lebih mendetail mengenai pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan beluntas (*Pluchea indica*) terhadap kadar hormon seks yang dapat mempengaruhi fisiologi reproduksi selain estrogen.



## DAFTAR PUSTAKA

- Afin, Tim. 2013. *Daun Dahsyat*. Jogjakarta: Katahati
- Ahemd, Sayed A dan Kamel, Emadeldin M. 2013. Phenolic constituents and biological activity of the genus *pluchea*. *Scholars Research Library Der Pharma Chemica*, 2013, 5(5):109-114. Egypt
- Al Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al Qurthubi*. Pustaka Azzam: Jakarta
- Al-Jazairi, S. A. 2009. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar Jilid 7*. Jakarta: Darus Sunnah Press
- Al-Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jabir. 2007. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar (jilid 4)*. Jakarta: Darus Sunnah
- Al-Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jabir. 2007. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar (jilid 3)*. Jakarta: Darus Sunnah
- Al-Maraghi, A. M. 2000. *Tafsir Al-Maraghi*. Semarang: CV. Toha Putra.
- al-Qarni. 2008. *Tafsir Muyassar*. Jakarta Timur: Qisthi Press
- Amita S. Rao, Nayanatara A. K, Rashmi Kaup S, Arjun Sharma, Arun Kumar B, Bhavesh D. Vaghasiya, Kishan K, Sheila R. Pai. 2011. Potential antibacterial and Antifungalactivity of aqueous extract of cynodon dactylon. *IJPSR 2(11)*: 2889-2893
- Amori G dan Clout M. 2002. *Rodent on Island: A Conservation Challenge*. In: *Singelton GR, L A Hinds, C H Krebs, D M Spratt (Ed). Rats, Mice and people: Rodent Biology and Management*. Canberra: Australian Centre for International Agriculture Research
- Amran, R. 2010. Menentukan Menopause Berdasarkan Indeks Maturasi dan pH Vagina. Palembang: *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan No.23*
- Andria, Y. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) terhadap Kadar Hormon Estradiol dan Kadar Hormon Progesteron Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Andriani, Y., dan Arisandi, Y.2008. *Khasiat Tanaman Obat*. Jakarta: Pustaka Buku Murah
- Anwar, Mochamad; Baziad, Ali; Prabowo, Prajitno. 2011. *Ilmu Kandungan Edisi Ketiga*. Jakarta: Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo

- Anonimous. 2003. *Mangrove Guide Book for Southeast Asia Group G*. London: Trees and Shrubs
- Ash-Shiddieqy, T. m. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: PT. Pustaka Rizki Putra
- Ath-Thabari, Abu Ja'far Muhammad bin Jarir. 2008. *Tafsir Ath-Thabari jilid 11*. Pustaka Azzam: Jakarta
- Bachman GA, Notelovitz M; Ginzales SJ; Thomson C; Morecraft BA. 1992. *Vaginal Dryness in menopausal Women: clinical characteristics and non hormonal treatment*, *Clin.Pract.Sex* 1992:7;25-3
- Baker DEJ, Lindsey JR, dan Weisborth SH. 1980. *The Laboratory Rat. Vol II. Research applications*. Academic Press Inc. London.
- Barnes, J., L.A. Anderson, J.D. Phillipson. 2002. *Herbal Medicines. Second Edition*. London: Pharmaceutical Press
- Booolootian, R. A. 1979. *Zoology*. New York: Macmillan Publishing Co., Inc.
- Buchanan *et al.*1998. Role of Stromal and epitel estrogen receptor in vaginal epithelial proliferation, Stratification, and Cornification.*Journal Endocrinology*, 139 (10)
- Cho, J. J., Cho, C., Kao, C., Chen, C., Tseng, C., & Lee, Y. 2012. Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* ( L .) Less . inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1–11. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-12-265>
- Dasuki, H., Yuniarto, B., Tohar, S., & Surur, B. 1990. *Al Qur'an dan Tafsirnya*. Jogjakarta: Universitas Islam Indonesia
- Dasuki, Undang Ahmad. 1991. *Sistematika Tumbuhan Tinggi*. Bandung : ITB
- Duke, J. 1987. *The Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton, Florida: 109-110: CRC Press Inc.
- Fahmi, R. 2002. Uji kandungan metabolit sekunder (Untuk survey di lapangan). *Makalah dalam Workshop Peningkatan Sumber Daya Manusia, Kajian Kimia Organik Bahan Alam Hayati dan Pelestarian Hutan, 21-27 Juli 2002*. Padang.
- Fitriyah. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban ) Terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Gruber, Christian J. et al. 2002. Production and Actions of Estrogens. *The New England Journal of Medicine* 346(5): 340–352.

Hafez ESE, Jainudeen MR, dan Rosnina Y. 2000. *Hormones Growth Factors and Reproduction*. Di dalam: *Reproduction in Farm Animals*. Ed ke -3. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins

Hafez, E. S. 1970. *Reproduction and Breeding Technique for Laboratory Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger

Hall, J. E. 2009. *Buku Saku Fisiologi kedokteran Guyton dan Hall, Ed. 11*. Jakarta: EGC

Harborne, J. B. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB

Hariadi. 2012. *Peluang Jitu Beternak Tikus Putih*. Yogyakarta: Pustaka Baru Press

Hasanah, Ifnaini Wirdatul. 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Spermatogenesis mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Biologi Fakultas SAINTEK UIN Maliki Malang

Hernawati. 2011. *Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon Dari Tanaman Kedelai*. Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia

Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid III*. Penerjemah : Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Jakarta : Yayasan Sarana Wana Jaya

Imani, A. K. 2005. *Tafsir Nurul Qur'an 8*. Jakarta: Al-Huda

Imani, A. K. 2006. *Nur al-Qur'an: An Enlightening Commentary into the Light of Holy Qur'an*. Isfahan Iraq: Imam Ali Public Library

Immanuel, A. I., Wantania, J., Suparman, E., & Lintong, P. 2010. Clinical Appearance and Vaginal Cytology of Atrophic Vaginitis in Postmenopausal Women. *Indones Journal Obstet Gynecol*, 34(2), 92–96

Jasin, M. 1984. *Sistematik Hewan Taksonomi Vertebrata*. Surabaya: Sinar Wijaya

Jayanti, Henny Dwi. 2007. *Pegagan. Karya ilmiah*. Padang : Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang

John, P. 1975. *The Laboratory Rat, Rattus norvegicus*. New York: Plenum Press

- Junquera dan Carnero.1982. *Histologi Dasar Edisi 3* (alih bahasa: Adji Dharma). Jakarta: EGC
- Katsir, Ibnu. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir jilid 3*. Bogor: Pustaka imam Asy-Syafi'i
- Khan I, Belanger A, Chen YDI, Gibori G. 1985. Influence of HDL on estradiol stimulation of luteal steroidogenesis. *Biol Reprod.* 32:92-104
- Khoiriyah, Lailatul, Retno Susilowati, and Umaiatus Syarifah. 2014. Pengaruh Ekstrak Air Daun Katu (*Saurpous androgynus* (L.) Merr) terhadap Panjang Fase Diestrus dan Proliferasi Epitel Vagina Mencit (*Mus musculus*) Betina Premenopause. *Skripsi*. Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang
- Kristanti, A. N. 2010. Potensi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Dosis Tinggi Sebagai Antifertilitas Pada Mencit (*Mus musculus*) Betina. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kumar, V; Abbas, A K; Fausto, N. 2005. *Pathologic basic of Disease. 7th Edition*. Philadelphia: Elsevier saunders.
- Kumar, Verendra dan Gupta. 2006. *Asiatic Centella*. Dalam Jurnal Penelitian. Provital Group
- Kurniawati, Ani, Latifah K. Darusman, and Rani Yulie Rachmawaty. 2005. Indian Pennywort (*Centella asiatica* L . ( Urban )) Growth , Yield , and Triterpenoid Content as Medicinal Substance on Various Levels of Shading. *Buletin Agronomi* 33(3): 62–67.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Jogjakarta: UGM Press.
- Lailani, P. K. 2008. *Analisis Keragaman Protein dan Fitokimia Tanaman Pegagan (Centella asiatica) Hasil Perbanyakan in vitro*. Biokimia Institut Pertanian Bogor.
- Lasmadiwati, Endah. 2004. *Pegagan: Meningkatkan Daya Ingat, Membuat Awet Muda, Menurunkan Gejala Stress dan Meningkatkan Stamina*. Jakarta : Penebar Swadaya
- Latief, Abdul. 2014. *Obat Tradisional*. Jakarta: EGC
- Limbong, Theresia. 2007. Pengaruh Ekstrak Ethanol Kulit Batang Pakettu (*Ficus superba* Miq) Terhadap Folikulogenesis Ovarium Mencit (*Mus musculus*). *Dalam abstrak jurnal penelitian*. Surabaya : Universitas Airlangga
- Lytle, C. F., & Meyer, J. R. 2005. *General Zoology Laboratory Guide*. New York: Mc Graw Hil Higher Education

- Lovick, T A. 2012. Estrous cycle and stress : influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45(April): 314–320.
- Macmillan KL dan Burke AJ. 1996. Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. *Bio. Reprod.* 25 : 253-260
- Malole, M., dan Pramono, C. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB
- Martalia, D., & Riyadi, S. 2012. *Biologi Reproduksi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Martono, B., Ghulamahdi, M., Darusman, L. K., Aziz, S. A., & Bemawie, N. 2010. Kriteria Penanda Seleksi Produktifitas Terna dan Asiatikosida pada Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Jurnal Littri*, 16(1), 12–19
- McNamara JP. 2006. *Principles of Companion Animal Nutrition*. Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Education
- Mirza, I., Riyadi, H., Khomsan, A., Marliyati, S. A., Damayanthi, E., & Winarto, A. 2013. The Effect of Ethanol Extract of Gotu Kola Leaf ( *Centella asiatica* ( L .) Urban ) on Hematological Profile , Activities , and Cognitive Function. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(2), 137–140
- Muhammad, B. 2007. *Tafsir Ibnu Katsiir*. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Murtie, Mey dan Ningrum, Kristin. 2013. *Tumbuhan Sakti*. Jakarta Timur: Dunia Sehat
- Mustikasari, Wahyuningrum. 2015. Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) terhadap Kadar Enzim Transaminase dan Gambaran Histologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nadhifah. Umi Hawwin. 2010. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban) Dosis Tinggi Sebagai Bahan Antifertilitas Terhadap Kadar Enzim GPT-GOT dan Gambaran Hstologi Hepar Mencit (Mus musculus) Betina*. Malang: Jurusan Biologi, Fakultas SAINTEK UIN Maliki Malang (Ringkasan Skripsi)
- Nursyah, D. A. 2012. Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi Yang Diberi Tepung Daging Teripang (*Holothuria scabra*). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor
- Padua, L. S.; Bunyapraphatsara, and Lemmons. 1999. Plant Resources of South-East Asia No. 12. *Medicinal and Poisonous Plants 1*. Netherlands: Backhuys Publishers

- Partodiharjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta Pusat: Mutiara Sumber Widya
- Pramanik, K. C., Biswas, R., Mitra, A., Mishra, M., Bandyopadhyay, D., & Chatterjee, T. K. 2007. Tissue culture of the plant *Pluchea indica* (L.) Less. and evaluation of diuretic potential of its leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 7(2), 197–204.
- Pujowati, Penny. 2006. Tanaman dan Sistem Terbuka Hijau Pengenalan Ragam Tanaman Lanskap. *Laporan Praktikum Tidak Diterbitkan*. Bogor: Sekolah Pasca Sarjana Departemen Arsitektur Lanskap FT IPB
- Puspaningtyas, D. E., & Utami, P. 2013. *The Miracle of Herbs*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Puspaningtyas, Desty Eryra dan Utami, Prapti. 2013. *The Miracle of Herbs*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Quthb, S. Sayyid. 2000. *Tafsir fi Zhilalil-Qur'an di bawah naungan Al-Qur'an*. Depok: Gema Insani
- Raden, Abkar. 2011. Efek Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) pada *Rattus norvegicus* Wistar yang Dilakukan Ovariectomi Terhadap Proliferasi Epitel pada Dinding Vagina. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan Vol. 4, No. 1*. Universitas Negeri Surakarta
- Robinson, Trevor. 1991. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB
- Rukmana, R. M. 2010. Pengaruh Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less) terhadap Proses Spermatogenesis pada Mencit (*Mus musculus* L). *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Saifudin, Aziz; Rahayu, Viesa dan Teruma, Hilwan Yuda. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Sastrosupadi, Adji. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian*. Kanisius: Yogyakarta
- Sathya dan Uthaya Ganga. 2008. *Therapeutic Uses of Centella (Hydrocotyle asiatica)*. India : Govt. Siddha Medical College asiatica
- Savitri, Evika Sandi. 2006. Studi Morfologi Tumbuhan Gulma yang Berpotensi Sebagai Obat di Lingkungan Kampus UIN Malang. *Dalam Jurnal Sainika vol.3 no. 02 Mei-Agustus 2006*. Malang : UIN Press
- Sawitri, Fauzi, dan Widyani, 2009. Kulit dan Menopause: Manifestasi dan Penatalaksanaan. Surabaya: *Artikel Berkala Ilmu Kesehatan , Kulit, dan kelamin Vol.21, No.1*

- Setiawan. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Trubus Agriwidya. Bogor
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati
- Silva JRV, Van den Hurk R, de Matos MHT, Dos Santos RR, Pessoa C, de Moraes MO, dan Figueiredo JR. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 61: 1691-1704
- Singapore government. 2013. *Pluchea indica*. <https://florafaunaweb.nparks.gov.sg/Special-Pages/plant-detail.aspx?id=5078>
- Sirait, Nursalam. 2008. Penggunaan Berbagai Jenis Tanaman Obat Untuk Menghilangkan Bau Badan. *Jurnal Potensi Ekonomi Tanaman Obat Sebagai Bahan Baku Jamu, Volume 14, No 3, ISSN: 0853 – 8204*
- Smith JB dan Mangkoewidjojo, S. 1988. *Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- Suheimi, K. 2007. *Fisiologi Folikulogenesis dan Ovulasi*. Dalam makalah pada symposium pertemuan ilmiah
- Sulistyaningsih. 2009. Potensi Daun Beluntas (*Pluchea indica* less.) sebagai Inhibitor terhadap *Pseudomonas aeruginosa* Multi Resistant dan Methicillin Resistant staphylococcus aureus. *Laporan Penelitian Mandiri*. Bandung: Universitas Padjajaran
- Surbakti, M., dan Winarto. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan Tanaman Penambah Daya Ingat*. Jakarta: Agromedia.
- Susetyarini, R. E. 2009. Efek Senyawa Aktif Daun Beluntas terhadap Kadar Testosteron Tikus Putih (*Ratus norwegicus*) Jantan. *GAMMA*, 5(1), 21–27.
- Syaifudin, BA. 2008. *Buku Panduan Praktis Pelayanan Kontrasepsi*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka
- Syamsudin. 2013. *Nutrasetikal*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Syamsuhidayat, S. S. Dan J. R. Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hal. 470-471.
- Thomas. 1992. *Tanaman Obat Tradisional 2*. Yogyakarta: Kanisius

- Toelihere MR. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung: Penerbit Angkasa
- Triyanti, Riesti. 2006. Identifikasi Inhibidin Dari Sel-Sel Granulosa Folikel Ovarium Kambing . *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Universitas Brawijaya
- Turner CD dan Bagnara JT. 1998. *Endokrinologi Umum Ed ke-6*. Surabaya: Unair Pr.
- Urasopon, Nontakorn et al. 2008. Isoflavone Content of Rodent Diets and its Estrogenic Effect on Vaginal Cornification in Pueraria mirifica -treated Rats. *Science Asia* 34: 371–376
- Warsito, Hendri. 2011. *Obat Tradisional Kekayaan Indonesia*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Weihe WH. 1989. *The Laboratory Rat. In the UFAW Hand Book on the Care and Management of laboratory Animals 6th*. TB Poole, Robinson, editor. Terjemahan dari: Longman Scientific & Technical. England: Bath Pr.
- Widyawati, Painsi Sri; Wijaya, C. Hanny; Hardjosworo, Peni Suprapti dan Sajuthi, Dondin. 2012. *Evaluasi Aktivitas Antioksidatif Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea indica ) berdasarkan Perbedaan Ruas Daun*. Bogor: IPB
- Yatim, Wildan. 1994. *Reproduksi dan Embryologi*. Bandung: Tarsito
- Yatim, Wildan. 1996. *Histologi*. Bandung: Tarsito
- Yu Y, Li W, Han Z, Luo M, dan Tan J. 2003. The effect of follicle -stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin like growth factor in the goat ovary. *Theriogenology* 60: 1691-1704
- Yusuf, Muhammad. 2012. *Buku Ajar Ilmu Reproduksi Ternak*. Makassar: Universitas Hasanuddin

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Perlakuan dan Analisa Statistik Panjang Diestrus

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-rata	Standar deviasi
	1	2	3	4			
K	2,53	3,27	3	2,67	11,47	2,8675	0,332904
P1	3,2	3	3	2,6	11,8	2,95	0,251661
P2	3,8	4	3	3	13	3,25	0,594362
P3	3,7	2,8	2,8	2,9	12,2	3,05	0,43589
P4	3,7	2,9	2,9	3,6	13,1	3,275	0,434933
P5	3,1	3,7	3,4	2,8	13	3,25	0,387298
Jumlah	20,03	19,34	17,63	17,57	74,57		

$$\begin{aligned}
 \bar{x} &= \frac{\text{total jumlah}}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}} \\
 &= \frac{74,57}{4 \times 6} \\
 &= 3,107083
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor koreksi (Fk)} &= \frac{\text{kuadrat jumlah total}}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}} \\
 &= \frac{74,57^2}{4 \times 6} \\
 &= 231,6952
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Jk total} &= 2,53^2 + 3,27^2 + 3^2 + \dots - \text{Fk} \\
 &= 238,0816 - 231,6952 \\
 &= 6,386396
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Jk perlakuan} &= \frac{2,53^2 + 3,27^2 + 3^2 + \dots}{\text{ulangan}} - \text{Fk} \\
 &= \frac{2,53^2 + 3,27^2 + 3^2 + \dots}{4} - \text{Fk} \\
 &= 232,312725 - 231,6952 \\
 &= 0,617521
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Jk galat} &= \text{Jk total} - \text{Jk perlakuan} \\
 &= 6,386396 - 0,617521 \\
 &= 5,768875
 \end{aligned}$$

s. K.	d.b.	jk	Kt	f hit.	f tabel
					0.05
Perlakuan	5	0,61752083	0,123504	0,385357	3,29
Galat	18	5,768875	0,320493		
Total	24-1= 23	6,38639583			

Kesimpulan:  $F_{\text{hitung}} < F_{\text{tabel}} = H_0$  diterima

Tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap panjang fase diestrus tikus betina



**Lampiran 2. Data dan analisa statistik indeks maturasi epitel vagina**

perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-rata	standart Deviasi
	1	2	3	4			
K	26,7	41,8	3	32	103,5	25,875	16,483
P1	50,43	56,12	60,25	56,62	223,42	55,855	4,058
P2	58,06	62,81	57,81	62,69	241,37	60,3425	2,782246
P3	68,44	55,75	71,81	65	261	65,25	6,9167
P4	17,25	19,19	22,81	26	85,25	21,3125	3,882614
P5	29,19	19	42,31	43,19	133,69	33,4225	11,55154
Jumlah	250,07	254,67	257,99	285,5	1048,23		

$$X = \frac{\text{total jumlah}}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}}$$

$$= \frac{1048,23}{4 \times 6}$$

$$= 43,67625$$

$$\text{Faktor koreksi (Fk)} = \frac{\text{kuadrat jumlah total}}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}}$$

$$= \frac{1048,23^2}{4 \times 6}$$

$$= 45782,76$$

$$\text{Jk total} = 26,7^2 + 41,8^2 + 3^2 + \dots - \text{Fk}$$

$$= 54514,2 - 45782,76$$

$$= 8731,448$$

$$\text{Jk perlakuan} = \frac{103,5^2 + 223,42^2 + 241,37^2 + \dots}{4} - \text{Fk}$$

$$= 53037,45 - 45782,76$$

$$= 7254,695$$

$$\text{Jk galat} = \text{Jk total} - \text{Jk perlakuan}$$

$$= 8731,448 - 7254,695$$

$$= 1476,753$$

S. K.	d.b.	Jk	kt	f hit.	f tabel
					0.05
perlakuan	5	7254,695	1450,939	17,68536	2,77
galat	18	1476,753	82,04182		
total	23	8731,448			

Kesimpulan:

F hitung > F tabel = H0 ditolak

Pemberian ekstrak daun pegagan dan beluntas memberikan pengaruh terhadap proliferasi epitel vagina berdasarkan indeks maturasi vagina tikus betina

Uji lanjut BNT 5%

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } \alpha &= t_{0,05(18)} \frac{\sqrt{2 \text{KT Galat}}}{\text{ulangan}} \\
 &= 2,101 \frac{\sqrt{2 \times 82,04182}}{4} \\
 &= 2,101 \times 6,4048 \\
 &= 13,4564
 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
P4	21,3125 ± 3,882614	a
K	25,875 ± 16,483	a
P5	33,4225 ± 11,55154	a
P1	55,855 ± 4,058	b
P2	60,3425 ± 2,782246	b
P3	65,25 ± 6,9167	b

Distribusi sel penyusun epitel vagina

Kel. perlakuan	Rata-rata sel			Total sel	Persentase sel (%)		
	P	I	S		P	I	S
K	63,81	17,34	15,08	96,24	66,31	18,02	15,67
P1	18,97	45,46	28,59	93,02	20,39	48,87	30,74
P2	17,91	43,03	38	98,94	18,1	43,5	38,4
P3	5,69	57,94	36,31	99,94	5,69	57,97	36,34
P4	66,66	24,44	8,88	99,97	66,68	24,45	8,88
P5	45,66	41,94	12,47	100,06	45,63	41,91	12,46

## Perhitungan indeks maturasi epitel vagina

Kel. Perlakuan	IM P (N Px0)	IM I (N Ix0,5)	IM S (N Sx1)	IM total	Keterangan
K	0	8,67	15,08	23,75	efek estrogen rendah
P1	0	22,73	28,59	51,32	efek estrogen sedang
P2	0	21,52	38	59,52	efek estrogen sedang
P3	0	28,97	36,31	65,28	efek estrogen tinggi
P4	0	12,22	8,88	21,09	efek estrogen rendah
P5	0	20,97	12,47	33,44	efek estrogen rendah



**Lampiran 3.** Rata-rata dan Hasil Perhitungan Tebal Epitel Vagina

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata	Standar deviasi
	1	2	3	4			
K	0,31	0,34	0,39	0,34	1,38	0,345	16,483
P1	0,32	0,53	0,35	0,43	1,63	0,4075	4,058
P2	0,39	0,4	0,39	0,29	1,47	0,3675	2,782246
P3	0,81	0,43	0,48	0,4	2,12	0,53	6,9167
P4	0,34	0,41	0,23	0,51	1,49	0,3725	3,882614
P5	0,58	0,41	0,81	0,72	2,52	0,63	11,55154

$$x = \frac{\text{total jumlah}}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}}$$

$$= \frac{10,61}{4 \times 6}$$

$$= 0,442083$$

$$\text{Faktor koreksi (Fk)} = \frac{\text{kuadrat jumlah total}}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}}$$

$$= \frac{10,61^2}{4 \times 6}$$

$$= 4,690504$$

$$\text{Jk total} = 0,31^2 + 0,34^2 + 0,39^2 + \dots - \text{Fk}$$

$$= 5,2255 - 4,690504$$

$$= 0,534996$$

$$\text{Jk perlakuan} = \frac{1,38^2 + 1,63^2 + 1,47^2 + \dots}{4} - \text{Fk}$$

$$= 4,946775 - 4,690504$$

$$= 0,256271$$

$$\text{Jk galat} = \text{Jk total} - \text{Jk perlakuan}$$

$$= 0,534996 - 0,256271$$

$$= 0,278725$$

s. K.	d.b.	Jk	kt	f hit.	f tabel
					0.05
perlakuan	5	0,256271	0,051254	3,309983	2,77
galat	18	0,278725	0,015485		
total	23	0,534996			

Kesimpulan:

F hit > f tabel = H0 ditolak

Kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas memberikan pengaruh terhadap ketebalan epitel vagina tikus betina. sehingga dilakukan uji lanjut BNT 5%

Uji lanjut BNT 5%

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } \alpha &= t_{0,05 (18)} \frac{\sqrt{2 \text{KT Galat}}}{\text{ulangan}} \\
 &= 2,101 \frac{\sqrt{2 \times 0,015485}}{4} \\
 &= 2,101 \times 0,0098 \\
 &= 0,0206
 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
Kontrol	0,344 ± 0,16483	a
50 mg/kg bb	0,3675 ± 0,3675	a
125 mg/kg bb	0,3725 ± 0,3725	a
25 mg/kg bb	0,4075 ± 0,4075	a
75 mg/kg bb	0,53 ± 0,53	ab
200 mg/kg bb	0,63 ± 0,63	b

#### Lampiran 4. Perhitungan SPSS pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap panjang diestrus

a. Uji normalitas data

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	panjang diestrus
N		24	24	24
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.50	2.50	62.100
	Std. Deviation	1.745	1.142	25.6153
Most Extreme Differences	Absolute	.138	.169	.156
	Positive	.138	.169	.156
	Negative	-.138	-.169	-.114
Kolmogorov-Smirnov Z		.678	.829	.764
Asymp. Sig. (2-tailed)		.748	.498	.604
a. Test distribution is Normal.				

b. Uji homogenitas data

##### Test of Homogeneity of Variances

panjang diestrus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.464	5	18	.798

c. Uji anova

##### ANOVA

panjang diestrus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2766.960	5	553.392	.808	.559
Within Groups	12324.320	18	684.684		
Total	15091.280	23			

Sig. > 0,05 artinya tidak terdapat pengaruh

**Lampiran 5. Perhitungan SPSS mengenai pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap indeks maturasi epitel vagina**

a. Uji normalitas data

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		perlakuan	ulangan	data hasil proliferasi indeks maturasi
N		24	24	24
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.50	2.50	43.6762
	Std. Deviation	1.745	1.142	19.48405
Most Extreme Differences	Absolute	.138	.169	.191
	Positive	.138	.169	.105
	Negative	-.138	-.169	-.191
Kolmogorov-Smirnov Z		.678	.829	.934
Asymp. Sig. (2-tailed)		.748	.498	.348
a. Test distribution is Normal.				

b. Uji homogenitas data

**Test of Homogeneity of Variances**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.516	5	18	.068

## c. Uji Anova

**ANOVA**

data hasil proliferasi indeks maturasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7254.695	5	1450.939	17.685	.000
Within Groups	1476.753	18	82.042		
Total	8731.448	23			

## d. Uji BNT 5%

data hasil proliferasi indeks maturasi

	perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	125 mg	4	21.3125	
	kontrol	4	25.8750	
	200 mg	4	33.4225	
	25 mg	4		55.8550
	50 mg	4		60.3425
	75 mg	4		65.2500
	Sig.			.438
Duncan <sup>a</sup>	125 mg	4	21.3125	
	kontrol	4	25.8750	
	200 mg	4	33.4225	
	25 mg	4		55.8550
	50 mg	4		60.3425
	75 mg	4		65.2500
	Sig.			.089

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

### Lampiran 6. Perhitungan SPSS mengenai pengaruh kombinasi ekstrak daun pegagan dan beluntas terhadap tebal epitel vagina

#### a. Uji Normalitas data

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		pemberian ekstrak pegagan dan beluntas	ulangan perlakuan	hasil tebal epitel vagina
N		24	24	24
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.50	2.50	.4404
	Std. Deviation	1.745	1.142	.15304
Most Extreme Differences	Absolute	.138	.169	.248
	Positive	.138	.169	.248
	Negative	-.138	-.169	-.118
Kolmogorov-Smirnov Z		.678	.829	1.217
Asymp. Sig. (2-tailed)		.748	.498	.104
a. Test distribution is Normal.				

#### b. Uji Homogenitas data

##### Test of Homogeneity of Variances

hasil proliferasi epitel vagina berdasarkan tebal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.622	5	18	.060

#### c. Uji Anova

##### ANOVA

hasil proliferasi epitel vagina berdasarkan tebal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.259	5	.052	3.333	.026
Within Groups	.280	18	.016		
Total	.539	23			

## d. Uji Lanjut Duncan

**hasil proliferasi epitel vagina berdasarkan tebal**

	pemberian ekstrak pegagan dan beluntas	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	Kontrol	4	.3438	
	dosis ekstrak 50mg	4	.3652	.3652
	dosis ekstrak 125mg	4	.3693	.3693
	dosis ekstrak 25mg	4	.4063	.4063
	dosis ekstrak 75mg	4	.5281	.5281
	dosis ekstrak 200mg	4		.6297
	Sig.		.334	.071
Duncan <sup>a</sup>	Kontrol	4	.3438	
	dosis ekstrak 50mg	4	.3652	
	dosis ekstrak 125mg	4	.3693	
	dosis ekstrak 25mg	4	.4063	
	dosis ekstrak 75mg	4	.5281	.5281
	dosis ekstrak 200mg	4		.6297
	Sig.		.074	.264

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

**Lampiran 7. Dokumentasi Proses penelitian**

Proses ekstraksi daun pegagan dan beluntas



Tikus perlakuan



Pemberian pelet



Injeksi prostaglandin



Mikroskop komputer



Vagina dan uterus tikus